

Regulation der Expression von Interleukin-2 und Apobec3G im Kontext der Infektion mit Immundefizienzviren

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von Heide Muckenfuß
aus Neustadt an der Weinstraße

Frankfurt a. M. 2004
(DF1)

Vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der Johann Wolfgang
Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan:Prof. Dr. Harald Schwalbe

Gutachter:Prof. Dr. Bernd Ludwig

Gutachter:Prof. Dr. Klaus Cichutek

Datum der Disputation: 20.12.2004

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	4
1.1. RETROVIREN	4
1.1.1. Aufbau und Replikationszyklus der Retroviren	4
1.1.2. Die Lentiviren der Primaten	5
1.1.3. Das simiane Immundefizienzvirus SIVagm	8
1.2. VIRUS/WIRTSZELLINTERAKTIONEN	9
1.2.1. Überblick	9
1.2.2. MAP-Kinasen und ihre Rolle in der HIV/SIV-Replikation	9
1.2.3. Struktur und Funktionen des Tat-Proteins	10
1.2.4. Die Rolle des Infektiositäts-Faktors Vif	14
1.3. INTERLEUKIN-2 ALS WICHTIGER FAKTOR FÜR DIE T-ZELLAKTIVIERUNG	16
1.4. ZIEL DER ARBEIT	19
2. MATERIALIEN UND METHODEN	20
2.1. METHODEN DER MOLEKULARBIOLOGIE	20
2.1.1. Verwendete Plasmide	20
2.1.2. Oligonukleotide	22
2.1.3. Herstellung kompetenter Bakterien (CaCl ₂ -Methode)	23
2.1.4. Transformation von kompetenten Bakterien	24
2.1.5. Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien	25
2.1.6. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	25
2.1.7. Restriktion von Plasmid-DNA	25
2.1.8. Agarose-Gelelektrophorese	26
2.1.9. Ligation	26
2.1.10. Präparation von Total-RNA und Herstellung von cDNA	27
2.1.11. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	27
2.2. METHODEN DER ZELLBIOLOGIE	30
2.2.1. Verwendete Zelllinien	30
2.2.2. Kultivierung von Zelllinien	30
2.2.3. Aufreinigung primärer mononukleärer Zellen aus peripherem Blut	31
2.2.4. Zellstimuli und Inhibitoren	32
2.2.5. Transiente Transfektion von Suspensionszellen	32
2.2.6. Transiente Transfektion von adhärenenten Zellen	33
2.2.7. Transfektion von primären Zellen	33
2.2.8. Infektion primärer T-Zellen	33
2.2.9. Anreicherung von Viruspartikeln durch Ultrazentrifugation	34

2.3.	METHODEN DER PROTEINBIOCHEMIE	35
2.3.1.	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	35
2.3.2.	Reverse Transkriptase-Test (RT-Test)	35
2.3.3.	Interleukin-2-ELISA	36
2.3.4.	Zelllyse	36
2.3.5.	Immunpräzipitation	37
2.3.6.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	38
2.3.7.	Western Blot-Analyse.....	39
2.3.8.	Luciferase-Assay.....	41
2.3.9.	Coomassie-Färbung von Proteinen	42
2.3.10.	Expression und Reinigung bakteriell exprimierter Fusionsproteine	42
2.3.11.	In-vitro-Kinase-Assay	43
2.3.12.	In-vivo-Markierung mit radioaktivem Orthophosphat	46
3.	ERGEBNISSE	47
3.1.	INDUKTION DER INTERLEUKIN-2-EXPRESSION DURCH DAS SIMIANE IMMUNDEFIZIENZVIRUS SIVAGM3	47
3.1.1.	Sekretion von Interleukin-2 nach Infektion humaner PBMC mit SIVagm3	47
3.1.2.	Transkriptionelle Aktivierung des IL-2-Promotors durch SIVagm3 und HIV-1	48
3.1.3.	Induktion der IL-2-mRNA-Synthese durch SIVagm3	49
3.1.4.	Beteiligte intrazelluläre Signalkaskaden	50
3.1.5.	Aktivierung responsiver DNA-Elemente des IL-2-Promotors durch SIVagm3	52
3.1.6.	Konstruktion eines Expressionsplasmids für SIVagm3-Tat	53
3.1.7.	Aktivierung des CD28/AP-1-responsiven Elements und des IL-2-Promotors durch SIVagm3-Tat und HIV-1(NL4-3)-Tat	54
3.1.8.	Vergleich der LTR-Aktivitäten von SIVagm3, HIV-1(NL4-3) und SIVsmm(PBj1.9)	56
3.1.9.	Tat als Phosphoprotein	57
3.1.9.1.	Phosphorylierung von SIVagm3-Tat durch eine assoziierte Kinase.....	57
3.1.9.2.	Herstellung von bakteriell exprimiertem SIVagm3-Tat	59
3.1.9.3.	Untersuchung einer Phosphorylierung des Tat-Proteins durch MAP-Kinasen	60
3.1.9.4.	Phosphorylierung von SIVagm3-Tat in verschiedenen Zelllinien	63
3.1.9.5.	Phosphorylierung von SIVagm3-Tat durch die Cyclin-abhängige Proteinkinase 9	64
3.1.9.6.	Einfluss der Depletion verschiedener CDKs auf die SIVagm3-Tat-Phosphorylierung	65
3.1.10.	Zusammenfassung der Ergebnisse	67
3.2.	WECHSELWIRKUNG DER MITOGENEN SIGNALKASKADE MIT DER APOBEC3G-EXPRESSION	69
3.2.1.	Einfluss der Zellaktivität auf die Apobec3G-Expression	69
3.2.2.	Rolle der Proteinkinase C bei der TPA-induzierten Apobec3G-Expression	70
3.2.3.	Rolle der MAP-Kinase ERK bei der TPA-induzierten Apobec3G-Expression	72
3.2.4.	Untersuchung einer möglichen Phosphorylierung von Apobec3G	73
3.2.5.	Koimmunpräzipitation von Vif und Apobec3G	74

3.2.6. Einfluss von Vif auf den Einbau von APOBEC3G in die Viruspartikel	75
3.2.7. Zusammenfassung der Ergebnisse.....	76
4. DISKUSSION.....	77
4.1. INTERLEUKIN-2-INDUKTION DURCH SIVAGM3	77
4.2. MOLEKULARE MECHANISMEN DER IL-2-INDUKTION DURCH SIVAGM3	79
4.3. TAT ALS PHOSPHOPROTEIN UND SEINE ROLLE BEI DER IL-2-INDUKTION	80
4.4. WECHSELWIRKUNGEN INTRAZELLULÄRER SIGNALWEGE MIT DER APOBEC3G-EXPRESSION	83
4.5. VIF/APOBEC3G-INTERAKTIONEN	85
5. ZUSAMMENFASSUNG	87
5.1. INDUKTION DER INTERLEUKIN-2-EXPRESSION DURCH DAS SIMIANE IMMUNDEFIZIENZVIRUS SIVAGM3	87
5.2. WECHSELWIRKUNG DER MITOGENEN SIGNALKASKADE MIT DER APOBEC3G-EXPRESSION	88
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	89
7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	100

1. EINLEITUNG

1.1. Retroviren

1.1.1. Aufbau und Replikationszyklus der Retroviren

Nach neuer taxonomischer Definition wird die Familie der Retroviren (*Retroviridae*) in 7 Genera unterteilt: Alpha-Retroviren, Beta-Retroviren, Gamma-Retroviren, Delta-Retroviren, Epsilon-Retroviren, Lentiviren und Spumaviren. Alle Retroviren sind ähnlich aufgebaut. Ihre Größe beträgt 80-100 nm im Durchmesser und sie sind von einer Lipid-Doppelmembran umhüllt, die sich von der Zellmembran ableitet. In die Virushülle sind virale Glykoproteine eingelagert, die aus einem externen und einem transmembranen Protein bestehen. Im Inneren der mit Matrixproteinen ausgekleideten Membran befindet sich eine geometrische Proteinstruktur, das Kapsid. Es enthält zwei identische, 7-12 kb große RNA-Moleküle, die im Komplex mit Nukleokapsidproteinen vorliegen. Wie eukaryontische mRNAs tragen sie am 5'-Ende eine 7-Methylguanin-Kappe und am 3'-Ende eine Polyadenylierung. Ebenfalls im Kapsid befinden sich die viralen Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase und Protease (Coffin et al. 1997, Modrow et al. 1998).

Die RNA der Retroviren enthält die drei Genbereiche *gag* (engl.: „group-specific antigens“), *pol* (engl.: „polymerase“) und *env* (engl.: „envelope“). Der *gag*-Bereich kodiert für die Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidproteine, *pol* enthält die Gene für Reverse Transkriptase, Integrase, Protease und RNase H, und aus den *env*-Genen entstehen die viralen Hüllproteine. Die sogenannten einfachen Retroviren besitzen nur diese drei Genbereiche. Komplexe Retroviren, zu denen auch die Lentiviren gehören, besitzen darüber hinaus weitere Gene, die regulatorischen Einfluss auf die Virusreplikation nehmen (Cullen et al. 1992). Bei allen Retroviren werden die kodierenden Genbereiche auf beiden Seiten von repetitiven Sequenzen eingerahmt, die nach der reversen Transkription auf der DNA die sogenannten LTRs (engl.: „long terminal repeat“) bilden. Diese Bereiche sind für die Integration in das Wirtsgenom essentiell, außerdem enthalten sie den viralen Promotor, der die Transkription der viralen Gene kontrolliert.

Abbildung 1.1 zeigt den Replikationszyklus der Retroviren. Die Infektion wird eingeleitet durch Bindung der viralen Hüllproteine an spezifische Oberflächenrezeptoren der Wirtszelle, wobei der Wirtstropismus von dem Vorhandensein der vom Virus benötigten Oberflächenrezeptoren bestimmt wird. Durch Fusion der Virusmembran mit der Wirtsmembran gelangt das Viruskapsid in die Zelle. Mithilfe des viralen Enzyms Reverse

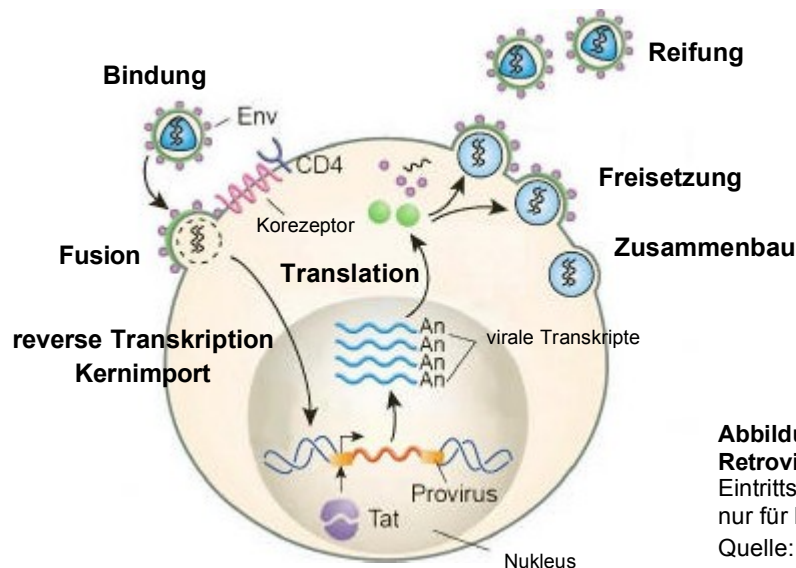


Abbildung 1.1 : Replikationszyklus der Retroviren. Die Verwendung von CD4 als Eintrittsrezeptor und Tat als Transaktivator ist nur für Lentiviren typisch.
Quelle: M. Stevenson 2003

Transkriptase wird nun die RNA in doppelsträngige DNA (dsDNA) umgeschrieben, der für Retroviren charakteristische und namensgebende Vorgang. Die virale DNA wird dann in den Zellkern transportiert und mithilfe des Enzyms Integrase in das Wirtsgenom integriert. Im Falle von HIV-1 konnte gezeigt werden, dass die Integration bevorzugt in aktiven Genbereichen erfolgt, vor allem in Genen, die durch die Infektion aktiviert werden (Schroder et al. 2002). Die viralen Gene werden nun von zelleigenen Enzymen exprimiert, wobei die Kontrolle über die Genexpression durch die LTRs erfolgt. Bei komplexen Retroviren üben zusätzlich *trans*-aktivierende Faktoren regulierenden Einfluss aus. In diesem Zusammenhang ist bei den Lentiviren das Tat-Protein (engl.: „transactivator of transcription“) von Bedeutung, welches als Transaktivator die LTR-abhängige Transkription steuert (siehe auch Kapitel 1.2.3.). Aus den Genprodukten und viraler RNA werden schließlich neue Viruspartikel zusammengesetzt, die ihre Lipidhülle beim Austritt aus der Wirtszelle erhalten. Nach einem Reifungsprozess, in welchem die Gag- und Gag/Pol-Vorläuferproteine mithilfe der viralen Protease prozessiert werden und das Kapsid seine charakteristische Struktur annimmt, können die entstandenen Viruspartikel neue Zellen infizieren (Modrow et al. 1998).

1.1.2. Die Lentiviren der Primaten

Humane und simiane Immundefizienzviren (HIV, SIV) sind die einzigen bekannten Lentiviren der Primaten. Wie in Abbildung 1.2 am Beispiel von HIV-1 gezeigt, besitzen sie als komplexe Retroviren neben *gag*, *pol* und *env* eine Reihe von Genen für regulatorische Proteine. Die Funktion dieser Proteine wird im folgenden kurz erläutert:

- Tat (engl.: „transactivator of transcription“) kontrolliert die LTR-abhängige Transkription der viralen Gene (Arya et al. 1985, Karn 1999).

- Rev (engl.: „regulator of expression of viral proteins“) ist ein posttranskriptioneller Regulator, der die Translation aller viralen Proteine außer Tat, Rev und Nef reguliert. Rev bindet an die ungespleißten oder einfach gespleißten viralen mRNAs und unterstützt deren Transport in das Zytoplasma (Heaphy et al. 1990).
- Vif (engl.: „viral infectivity factor“) inhibiert die Wirkung des zellulären Proteins Apobec3G, das die Infektiosität der entstehenden Viruspartikel herabsetzt (Fisher et al. 1987, Yu et al. 2003).
- Vpr (engl.: „viral protein rapid“) wird für einen effizienten Kerntransport des Präintegrationskomplexes benötigt und kann möglicherweise auch als transkriptioneller Transaktivator wirken (Popov et al. 1998, Philippon et al. 1999).
- Vpu (engl.: „viral protein U“) kommt nur bei HIV-1 und SIVcpz vor. Das Protein verhindert die Bindung zwischen neusynthetisiertem Hüllprotein gp160 und dem Eintrittsrezeptor CD4 im endoplasmatischen Retikulum und beschleunigt damit die Spaltung von gp160 in gp120 und gp40 (Willey et al. 1992).
- Vpx (engl.: „viral protein x“) kommt nur bei HIV-2- und SIV-Stämmen vor. Das *vpx*-Gen ist vermutlich durch eine Genduplikation aus *vpr* entstanden und wird für die Virusreplikation benötigt (Ueno et al. 2003). Vermutlich ist es ebenfalls am Kerntransport des Präintegrationskomplexes beteiligt (Pancio et al. 2000).
- Nef (engl.: „negative factor“) vermindert die Expression von CD4 und MHC-I auf der Zelloberfläche, wodurch die Freisetzung neuer Viruspartikel erleichtert, bzw. die Präsentation viraler Peptide erschwert wird (Garcia et al. 1991, Schwartz et al. 1996). Auch eine verminderte Oberflächenexpression des CD3/T-Zellrezeptor-Komplexes und des Korezeptors CD28 wurde beschrieben (Kirchhoff et al. 2004, Schaefer et al. 2002). Nef hat zudem einen aktivierenden Einfluss auf die Zelle, wodurch die Virusreplikation in nicht-proliferierenden Zellen erleichtert wird (Wei et al. 2003).

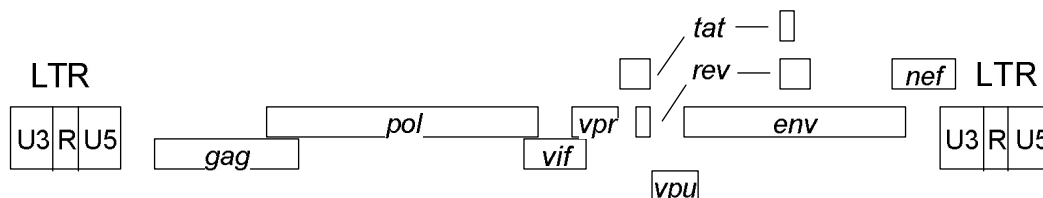


Abbildung 1.2 : Genomaufbau eines komplexen Retrovirus am Beispiel von HIV-1. Dargestellt ist die Struktur des retroviralen Provirus mit den flankierenden LTRs. Modifiziert nach Coffin et al. 1997

Simiane Immundefizienzviren sind unter den Primaten Afrikas sehr weit verbreitet. Bisher wurden 31 mit SIV infizierte Spezies identifiziert, bei 21 Arten wurde das Virusgenom bereits

sequenziert (Peeters et al. 2001). Aufgrund dieser Daten werden humane und simiane Immundefizienzviren phylogenetisch in sechs Gruppen unterteilt: SIVcpz/HIV-1, SIVsmm/HIV-2/SIVmac, SIVagm, SIVsyk, SIVlhoest und SIVcol (cpz: Schimpanse (*Pan troglodytes*), smm: rauchgraue Mangabe (*Cercocebus atys*), agm: Afrikanische Grüne Meerkatze (Genus *Chlorocebus*), syk: Weißkehlmeerkatze (*Cercopithecus mitis albogularis*), lhoest: Vollbartmeerkatze (*Cercopithecus lhoesti*), col: Mantelaffe (*Colobus guereza*)) (Peeters et al. 2001, Hirsch 2004). Die humanen Immundefizienzviren sind sehr wahrscheinlich durch Zoonose aus simianen Viren hervorgegangen. Aufgrund der Sequenzanalogien wird SIVcpz als Ursprung von HIV-1 angesehen, während HIV-2 von SIVsmm abstammt (Hirsch et al. 1989, Huet et al. 1990, Gao et al. 1999).

Eine Infektion des Menschen mit HIV führt zum Krankheitsbild der erworbenen Immundefizienz AIDS (engl.: „acquired immunodeficiency syndrome“) und ist durch einen langsamen Verlauf der Pathogenese gekennzeichnet (Barre-Sinoussi et al. 1983, Popovic et al. 1984). In den ersten zwei Wochen nach der primären Infektion treten häufig akute grippe-ähnliche Symptome auf. Nach 3-6 Wochen werden erste HIV-spezifische Antikörper gebildet und die Viruslast erreicht ihren vorläufigen Maximalwert. Aufgrund der steil ansteigenden Zahl HIV-spezifischer CD8-positiver T-Lymphozyten kommt es bald darauf zu einem starken Abfall der Viruslast. Es folgt eine lange asymptomatische Phase der Latenz, in der die Zahl der CD4-positiven T-Zellen langsam sinkt. Nach ca. 8-10 Jahren fällt die Zahl der CD4⁺ T-Zellen in den meisten Fällen unter 200/μl während gleichzeitig die Viruslast stark ansteigt. Mit dem Krankheitsbild AIDS treten nun opportunistische Infektionen auf, die aufgrund der zerstörten Immunfunktionen schließlich zum Tod führen (Andersson 2001, Stevenson 2003). Während HIV im Menschen für das beschriebene Krankheitsbild verantwortlich ist, sind simiane Immundefizienzviren für ihre natürlichen Wirte nicht pathogen, das heißt wildlebende, SIV-infizierte Primaten zeigen keinerlei klinische Symptome. Man geht davon aus, dass sich während einer langen Zeit der Koevolution ein für beide Seiten vorteilhafter, apathogener Infektionsverlauf entwickelt hat (Müller et al. 2003, Chakrabarti 2004). Kommt es zu einer Übertragung simianer Immundefizienzviren von ihren natürlichen Wirten auf eine andere Art, so sind diese für den neuen Wirt meist pathogen. Neben HIV-1 und HIV-2 stellt SIVmac ein weiteres Beispiel für eine solche Transmission zwischen zwei Spezies dar (Letvin et al. 1983, Chakrabarti et al. 1987). SIVmac gehört in die phylogenetische Gruppe von SIVsmm und wurde vermutlich von Mangaben auf Makaken übertragen, die in Gefangenschaft lebten. Infektion von Makaken mit SIVmac führt zu einer AIDS-ähnlichen Erkrankung (simian AIDS, SAIDS) und stellt daher ein häufig verwendetes Tiermodell in der HIV/AIDS-Forschung dar.

1.1.3. Das simiane Immundefizienzvirus SIVagm

Afrikanische Grüne Meerkatzen (Genus *Chlorocebus*) sind in ganz Mittel- und Südafrika verbreitet. Sie werden anhand ihrer geografischen Verbreitung in die vier Arten Grivet (*C. aethiops*), Vervet (*C. pygerythrus*), Sabaeus (*C. sabaeus*) und Tantalus (*C. tantalus*) unterteilt (Allan et al. 1991). 30-50 % der wildlebenden Tiere sind mit SIVagm infiziert. Da jede Spezies von einem eigenen Subtyp infiziert wird, teilt man SIVagm ebenfalls in diese vier Gruppen ein (Müller et al. 2003). SIVagm repliziert in Afrikanischen Grünen Meerkatzen mit relativ hohen Titern, ohne jedoch einen kritischen Abfall der CD4-T-Zellzahl oder andere Krankheitssymptome hervorzurufen (Broussard et al. 2001, Gueye et al. 2004). Die Ursachen der Apathogenität für natürlich infizierte Primaten sind noch nicht völlig aufgeklärt. Die Apathogenität kann jedoch nicht damit erklärt werden, dass eine Infektion der natürlichen Wirte keine Immunantwort mehr auslöst, da eine Aktivierung zytotoxischer T-Lymphozyten beobachtet wurde (Kaur et al. 2000, Kaur et al. 2001). Trotzdem scheint der allgemeine Aktivierungsstatus des Immunsystems geringer zu sein, als bei Infektionen mit pathogenem Verlauf. So werden bei natürlich infizierten Affen keine Lymphadenopathien und eine schwächere Oberflächenexpression von Aktivierungs- und Proliferationsmarkern auf T-Zellen festgestellt (Silvestri et al. 2003, Chakrabarti et al. 2004). Es wird vermutet, dass eine ausgewogene Balance zwischen T-Zell-Regeneration und T-Zell-Verlust durch virus-induzierten und aktivierungs-induzierten Zelltod (AICD, engl.: „activation-induced cell death“) die durch Verlust der CD4-positiven T-Lymphozyten verursachte Immundefizienz verhindert (Hirsch et al. 2004).

Im Falle von SIVagm scheinen Gründe für die Apathogenität jedoch auch im Virus selber zu liegen, da SIVagm auch in heterologen Primaten im Allgemeinen keine Erkrankung hervorruft. So blieben SIVagm-infizierte Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) bzw. Husarenaffen (*Erythrocebus patas*) ohne klinische Symptome (Honjo et al. 1990, Johnson et al. 1990, Muller-Trutwin et al. 1996). Eine der wenigen Ausnahmen ist ein 1995 beschriebenes Isolat, welches in Schweinsaffen (*Macaca nemestrina*) SAIDS induzierte (Hirsch et al. 1995). Durch den Vergleich der Infektion mit SIVagm und pathogenen Virusstämmen können daher wichtige Schlüsse auf die Ursachen der Pathogenität humaner und simianer Immundefizienzviren gezogen werden.

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete molekulare Klon SIVagm3 wurde 1989 aus einem Virusisolat hergestellt, welches aus einem Tier der Primatenhaltung des Paul-Ehrlich-Instituts gewonnen wurde (Kraus et al. 1989, Baier et al. 1989).

1.2. Virus/Wirtszellinteraktionen

1.2.1. Überblick

Um ihr Ziel einer optimalen Replikation zu erreichen, beeinflussen Immundefizienzviren die natürlichen Funktionen der infizierten Zellen auf vielfältige Weise. Bereits vor dem Eintritt in die Zielzelle werden über die Bindung des Virus an Oberflächenrezeptoren intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert. Im Inneren der Zelle finden dann zahlreiche weitere Interaktionen statt, die vor allem durch die regulatorischen Proteine des Virus vermittelt werden. Auf der anderen Seite hat die zelluläre Umgebung ihrerseits einen großen Einfluss auf die Virusreplikation. Als Beispiel sei hier der Aktivierungsstatus der Zelle genannt, der maßgeblich darüber entscheidet, ob es zu einer aktiven Virusreplikation oder zu einem Zustand der Latenz kommt. Die zahlreichen Interaktionen zwischen Wirtszelle und Virus sollen hier nicht detailliert ausgeführt werden. Wichtig für die vorliegende Arbeit sind die Rollen der zellulären MAP-Kinasen, sowie der viralen Proteine Tat und Vif, die in den folgenden Kapiteln vorgestellt werden.

1.2.2. MAP-Kinasen und ihre Rolle in der HIV/SIV-Replikation

Die Familie der MAPK (engl.: „mitogen-activated protein kinases“) spielt in eukaryontischen Zellen eine wichtige Rolle bei der Übermittlung von extrazellulären Signalen. MAPK sind Serin/Threonin-Kinasen, die im Zytoplasma als Antwort auf extrazelluläre Stimuli aktiviert werden, in den Zellkern wandern und dort Transkriptionsfaktoren und andere Zielproteine phosphorylieren. Damit beeinflussen sie wichtige zelluläre Vorgänge wie Zellproliferation, Differenzierung, Stressreaktionen und Zelltod (Seger et al. 1995, Chang et al. 2001). Die drei wichtigsten Vertreter der MAP-Kinasen, die jeweils in verschiedenen Isoformen vorkommen, werden durch ERK1/2 (engl.: „extracellular signal-regulated protein kinase“), JNK1/2 / SAPK α/β (engl.: „c-Jun NH2-terminal kinase/stress-activated protein kinase“) und p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$ repräsentiert. Während ERK die eigentliche mitogen-aktivierte Proteinkinase darstellt, spielen JNK/SAPK und p38 vor allem bei der zellulären Stressantwort eine Rolle (Rouse et al. 1994, Seger et al. 1995, Kyriakis et al. 1994). Allen MAPK-Signalwegen ist gemeinsam, dass es sich um evolutionär hochkonservierte Kaskaden aus drei nacheinandergeschalteten Kinasen handelt. Die MAP-Kinase wird durch spezifische duale Phosphorylierung eines Thr-X-Tyr-Motivs durch eine MAPK Kinase (MAPKK) aktiviert, nachdem die MAPKK ihrerseits von einer MAPKK Kinase (MAPKKK) durch zweifache Phosphorylierung aktiviert wurde. Die Aktivität der MAPKKK wird durch kleine G-Proteine reguliert, die mit den zytoplasmatischen

Domänen von Oberflächenrezeptoren (Rezeptortyrosinkinasen) assoziiert sind und durch Bindung von Signalmolekülen an den entsprechenden Rezeptor aktiviert werden (Naumann et al. 1996, Rincon et al. 2001, Kolch et al. 2000, Lodish et al. 2001).

MAPK-Signalkaskaden können jedoch auch durch virale Proteine aktiviert werden. Mehrere Publikationen beschreiben eine Aktivierung der ERK-, JNK/SAPK- und p38-Signalwege durch Bindung der Hüllproteine von HIV oder SIV an ihre Eintrittsrezeptoren (Popik et al. 2000, Cicala et al. 2002). Im Falle von HIV-1 konnte gezeigt werden, dass die Bindung des viralen Hüllproteins gp120 an CD4 zu einer Autophosphorylierung der T-Zell-spezifischen Tyrosinkinase Lck führt, die an die zytoplasmatische Domäne des CD4-Rezeptors gebunden ist (Popik et al. 1996). Lck aktiviert dann die Raf-1 Kinase, die im ERK-Signalweg die MAPKKK darstellt (Popik et al. 1998). Neben dem Hüllprotein haben auch regulatorische Proteine von HIV-1 Einfluss auf die MAPK-vermittelte Signaltransduktion. So verstärkt HIV-1-Nef in stimulierten T-Zellen die Aktivierung von ERK (Schrager et al. 2002), während in promonozytischen Zellen exogenes Nef als Aktivator von JNK/SAPK beschrieben wurde (Varin et al. 2003). Auch extrazelluläres Tat kann die MAP-Kinasen ERK und JNK/SAPK in T-Zellen aktivieren (Mischianti et al. 1999).

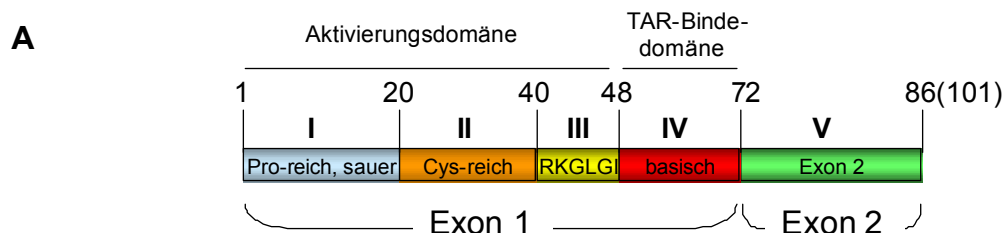
Diese MAPK-Aktivierung hat einen Einfluss auf verschiedene Stadien des viralen Replikationszyklus. So kann in Provirus-tragenden Zellen die Reaktivierung des Virus durch Aktivierung der ERK- oder JNK-Signalwege ausgelöst werden (Flory et al. 1998, Yang et al. 1999, Chen et al. 2000). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Infektiosität von HIV-1 durch ERK beeinflusst wird (Yang et al. 1999, Jaque et al. 1998), und eine aktuelle Publikation beschreibt, dass ERK2 durch Phosphorylierung des p6(Gag)-Proteins den Zusammenbau und die Freisetzung der Viruspartikel reguliert (Hemonnot et al. 2004). Auch eine Phosphorylierung von HIV-1-Vif durch ERK wurde beobachtet. Mutation dieser Phosphorylierungsstelle führte zu einem Verlust der Vif-Aktivität und Inhibition der HIV-Replikation (Yang et al. 1998). Weitere HIV-Proteine, wie Tat, Ref und Nef werden möglicherweise ebenfalls phosphoryliert. Allerdings wurde dies erst in Ansätzen untersucht, und es ist noch völlig unerforscht, inwieweit die Aktivität dieser Proteine durch die Phosphorylierung reguliert wird (Yang et al. 1999).

1.2.3. Struktur und Funktionen des Tat-Proteins

Das Tat-Protein (engl.: „transactivator of transcription“) spielt bei allen Lentiviren eine wichtige Rolle als Transaktivator der viralen Genexpression (Rice et al. 1988). Es wird durch zwei Exons kodiert und als eines der ersten Proteine im Replikationszyklus exprimiert

(Brigati et al. 2003, Karn et al. 1999). HIV-1-Tat besteht meistens aus 101 Aminosäuren, obwohl viele Laborstämme eine verkürzte Form des Proteins exprimieren, das aus 86 Aminosäuren besteht. Im Gegensatz dazu sind die Tat-Proteine von HIV-2 und den meisten SIV mit 130 Aminosäuren deutlich größer (Kuiken et al. 2000). Die Struktur der Tat-Proteine von HIV-1(NL4-3), HIV-2(BEN) und SIVagm3 ist in Abbildung 1.3 schematisch dargestellt. Anhand struktureller und funktionaler Eigenschaften kann Tat in mindestens fünf Bereiche unterteilt werden (Jeang 1996, Liang et al. 2002):

- Die saure, prolin-reiche Region enthält viele Proline und saure Aminosäuren.
- Die cystein-reiche Region enthält hochkonservierte Cysteine, die für die Ausbildung intramolekularer Disulfidbrücken wichtig sind.
- Die Kernregion beinhaltet ein bei HIV und SIV konserviertes RKGLGI-Motiv, das für die Transaktivierung essentiell ist.
- Die basische Region enthält sehr viele basische Aminosäuren. Sie ist notwendig für die Bindung an die TAR-Region (unten beschrieben) und die Kernlokalisierung. Außerdem ist sie verantwortlich für die Fähigkeit des Tat-Proteins die Zellmembran zu durchqueren.
- Das zweite Exon ist für die Replikationsfähigkeit des Virus wichtig, über seine genaue Funktion ist aber noch wenig bekannt.



B

HIV-1(NL4-3)-Tat: 86aa

1 MEPVDPRLPE WKHPGSQPKT ACTN**CYCKK**CFHCQVCFMT **KALGISYGRK** **KRRQRRRAHQ**
 61 NSQTHQASLS KQ**PTSQSRGD** **PTGPKE**

HIV-2(BEN)-Tat: 130aa

1 METPLKAPES SLKPYNEPSS CTSERDVTAQ ELAKQGEELL AQLHRPLEPC TNK**CYKRC**S
 61 FH**QQL****CFSKK** **GLGISYERKG** **RRRRTPRKTK** TPSPSAPDKS **ISTRTGDSQP** **TKEQKKTSEA**
 121 **TVVTT****CGLGQ**

SIVagm3-Tat: 119aa

1 MDKGEDEQGA YHQDLIEQLK APLKRC**TNKC** **YKCCC**YHCQ L**CFLQKGLGV** TYHAP**RIRRK**
 61 **KIAPLDRFPE** QKQ**SISTRGR** **DSQTTQKGQE** **KVETSARTAP** **SLGRKNLAQQ** **SGRATGASD**

Abbildung 1.3 : Struktur des Tat-Proteins. (A): Schematische Darstellung der fünf Regionen des Tat-Proteins am Beispiel von HIV-1. Die Zahlen geben die Anzahl der Aminosäuren an. (B): Aminosäuresequenzen der Tat-Proteine von HIV-1(NL4-3), HIV-2(BEN) und SIVagm3. Die für die einzelnen Tat-Regionen charakteristischen Aminosäuren sind entsprechend des Schemas in A farblich dargestellt.

Die ersten drei Regionen des Tat-Proteins werden auch als Aktivierungsdomäne bezeichnet, da sie bei der LTR-Transaktivierung mit zellulären Proteinen interagieren, während die basische Domäne an die TAR-Region bindet. Diese vier Regionen des ersten Exons sind für die Transaktivierung der viralen Genexpression hinreichend (Hauber et al. 1989, Ruben et al. 1989). Die Funktion des zweiten Exons ist dagegen noch unklar, obgleich Studien zeigen, dass die Replikationsfähigkeit von Tat-Exon2-deletierten Mutanten von HIV-1 und SIVmac *in vitro* und *in vivo* deutlich reduziert ist (Verhoef et al. 1998, Smith et al. 2003). Die Bedeutung des zweiten Exons für die Pathogenese lässt sich auch daran erkennen, dass die mit der Exon2-deletierten SIVmac-Mutante infizierten Schweinsaffen eine relativ konstante Zahl CD4-positiver T-Lymphozyten aufrecht erhielten und im Gegensatz zu den wildtyp-infizierten Tieren nicht erkrankten (Smith et al. 2003).

Die Hauptfunktion des Tat-Proteins besteht in der Aktivierung der LTR-abhängigen Transkription. Dabei handelt es sich bei Tat nicht um einen gewöhnlichen Transkriptionsfaktor, sondern um einen RNA-bindenden Transaktivator. Die Transkription der Virusgene wird durch den in der 5'-LTR gelegenen viralen Promotor kontrolliert. Dieser enthält mit einer TATA-Box und Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren SP-1 und NF- κ B die klassischen Elemente eines Promotors (Garcia et al. 1987, Nabel et al. 1987). Wie Abbildung 1.4 zeigt, wird die Transkription durch Bindung des RNA-Polymerase II-Holoenzym an die LTR eingeleitet. Nach Phosphorylierung von Heptapeptidwiederholungen

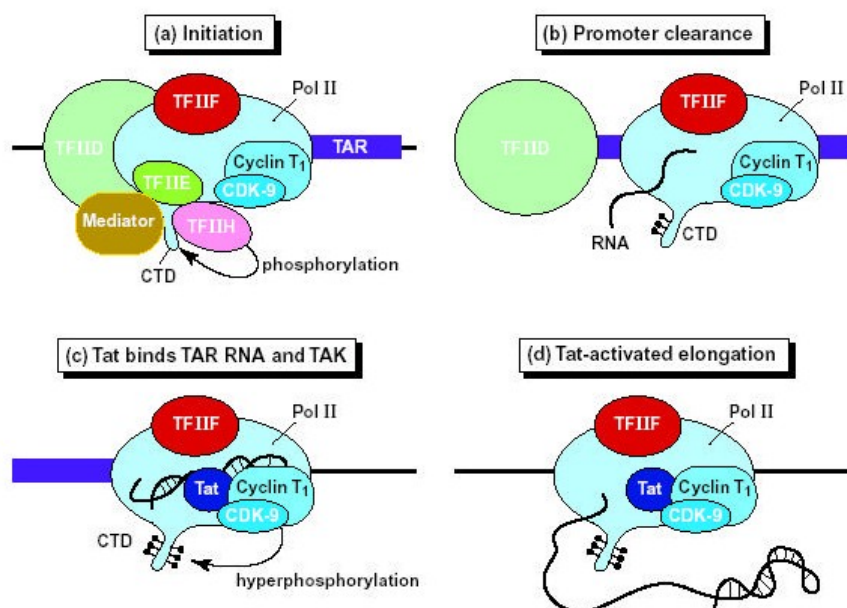


Abbildung 1.4 : Modell der Aktivierung der RNA-Polymerase II durch Tat und zelluläre Kofaktoren.

Quelle: <http://www.hiv.lanl.gov/content/hiv-db/COMPENDIUM/2000/partI/Karn.pdf>

in der C-terminalen Domäne (CTD) der RNA-Polymerase II durch die Cyclin-abhängige Proteinkinase 7 (CDK7), beginnt die RNA-Synthese. Ohne Tat entstehen jedoch nur kurze Transkripte, da die RNA-Polymerase II nach ca. 70 Basen stoppt. Tat verstärkt nun die Prozessivität des RNA-Polymerase II-Komplexes, indem das Protein an die sogenannte TAR-Region der entstehenden mRNA bindet. Diese wird durch die 59 ersten transkribierten Basen gebildet, die eine Haarnadelstruktur annehmen. Tat bindet zusätzlich an einen Proteinkomplex aus dem Cyclin T1 und der Cyclin-abhängigen Proteinkinase 9 (CDK9) und bringt diesen damit in räumliche Nähe zu dem Transkriptionskomplex. Die CDK9 hyperphosphoryliert nun den C-Terminus der RNA-Polymerase II, wodurch eine erhöhte Prozessivität des Elongationskomplexes hervorgerufen wird (Karn 1999).

Neben der Verstärkung der Prozessivität der RNA-Polymerase II beeinflusst Tat die Transkription der viralen Gene auch durch Beschleunigung der transkriptionellen Reinitiation und durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, der an die LTR bindet (Jeang 1996). Zudem wurde gezeigt, dass Tat Histon-Acetyltransferasen an den Ort der Transkription rekrutiert und selbst acetyliert werden kann. Obwohl es kontroverse Publikationen gibt, geht man davon aus, dass dadurch die Histone im Bereich des Provirus acetyliert werden, wodurch die Histon-DNA-Interaktion geschwächt und der Zugang des Transkriptionskomplexes zur DNA erleichtert wird (Kiernan et al. 1999, Benkirane et al. 1998, Col et al. 2002).

Neben der LTR-Transaktivierung erfüllt das Tat-Protein noch eine Reihe anderer Funktionen. So konnte gezeigt werden, dass Tat für eine effiziente reverse Transkription von HIV-1 benötigt wird, da es die Bindung des tRNA-Primers an die virale RNA begünstigt (Harrich et al. 1997, Kameoka et al. 2002). In späteren Stadien des Replikationszyklus dagegen, wenn die neu-synthetisierte RNA in Viruspartikel verpackt wird, scheint Tat die reverse Transkription zu inhibieren (Kameoka et al. 2001).

Eine weitere ungewöhnliche Eigenschaft des Tat-Proteins ist seine Fähigkeit, die Zellmembran durchqueren zu können. Tat ist dadurch in der Lage, die infizierte Zelle zu verlassen und auch Funktionen nicht-infizierter Zellen zu beeinflussen (Ensoli et al. 1993). So wurde beobachtet, dass extrazelluläres Tat in CD4-positiven T-Zellen die MAP-Kinasen ERK und JNK aktiviert, während in Makrophagen und Neuronen Ca^{2+} -Influx induziert wird (Mischianti et al. 1999, Mayne et al. 2000). In verschiedenen Zelltypen konnte eine Aktivierung der Produktion proinflammatorischer Zytokine durch Tat nachgewiesen werden (Nath et al. 1999, Pu et al. 2003). Da die meisten dieser Untersuchungen *in vitro* mit rekombinantem Tat durchgeführt wurden, ist jedoch noch unklar, ob die Konzentration extrazellulären Tats *in vivo* tatsächlich ausreicht, um diese Effekte hervorzurufen (Karn 1999).

Eine weitere wichtige Funktion des Tat-Proteins in der infizierten Zelle besteht in der Modifikation der Expression zellulärer Gene. So wurde gezeigt, dass Tat in T-Lymphozyten die Expression des T-Zell-Wachstumsfaktors Interleukin-2 erhöht und damit die Zellaktivität verstärkt, wodurch günstige Bedingungen für die Virusreplikation geschaffen werden (Ott et al. 1997, Wu et al. 2001). In T-Zellen konnte auch eine verstärkte Induktion des chemotaktischen Faktors Interleukin-8 durch Tat gezeigt werden (Ott et al. 1998), während in Monozyten und Makrophagen die Synthese von TNF- α induziert wurde (Bennasser et al. 2002). Eine besondere Rolle scheint die Modifikation der zellulären Genexpression durch Tat jedoch in dendritischen Zellen zu spielen. Die unreifen dendritischen Zellen der Schleimhäute stellen häufig die ersten Zielzellen bei einer Infektion mit HIV oder SIV dar. In diesen Zellen induziert Tat die Expression einer Reihe von Chemokinen wie IP-10 (engl.: „interferon-gamma inducible protein 10“), MCP-2 (engl.: „monocyte chemoattractant protein 2“) und MCP-3, die sekretiert werden und Monozyten und aktivierte T-Zellen chemotaktisch anziehen. Auf diese Weise rekrutiert das Virus die wichtigsten Zielzellen für seine Replikation zu dem Ort der initialen Infektion (Izmailova et al. 2003).

1.2.4. Die Rolle des Infektiositäts-Faktors Vif

Schon 1987 wurde gezeigt, dass das 23 kDa große Phosphoprotein Vif (engl.: „virion infectivity factor“) für die Replikationsfähigkeit von HIV-1 in PBMC und anderen sogenannten „nicht-permissiven“ Zellen essentiell ist, während in permissiven Zellen, zu denen die meisten T-Zelllinien gehören, sich auch Vif-deletierte Viren normal vermehren können (Fisher et al. 1987, Strebel et al. 1987, Gabuzda et al. 1992). In nicht-permissiven Zellen entstehen nach Infektion mit Vif-deletierten Virusmutanten zwar Nachkommenviren, die Infektiosität dieser Partikel ist jedoch um den Faktor 1000-2500 reduziert. Erst kürzlich konnte der zelluläre Gegenspieler des viralen Proteins identifiziert und damit die genaue Funktion des Vif-Proteins aufgeklärt werden (Sheehy et al. 2002, Harris et al. 2003, Mangeat et al. 2003, Zhang et al. 2003). Die zelluläre DNA-Deaminase Apobec3G (CEM15) wurde als antiviraler Faktor identifiziert, der in nicht-permissiven Zellen, nicht aber in permissiven Zelllinien exprimiert wird. Abbildung 1.5 zeigt den Wirkungsmechanismus von Apobec3G. Nach Infektion einer nicht-permissiven Zelle mit einem Vif-deletierten Virus, wird Apobec3G in die entstehenden Viruspartikel verpackt. Wenn diese Partikel nun ihrerseits eine Zelle infizieren und die reverse Transkription beginnt, deaminiert Apobec3G die Minusstrang-DNA, so dass aus 2'-Deoxycytidin 2'-Deoxyuridin entsteht. Durch diese Modifizierung wird die Virusreplikation auf verschiedene Weise beeinträchtigt. Die virale DNA kann nun durch die zelluläre Uracil-DNA-Glycosylase deglykosyliert werden, was zu Strangbrüchen führt, oder

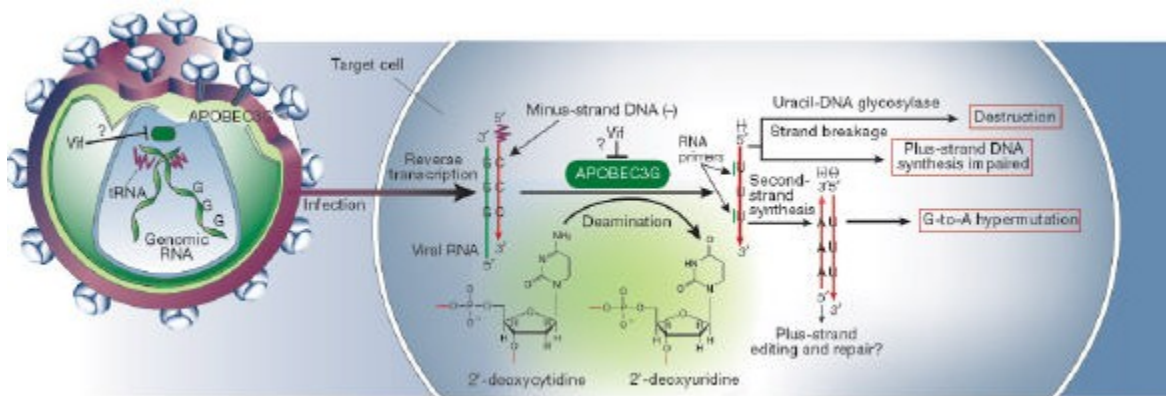


Abbildung 1.5 : Inhibition der Virusreplikation durch Apobec3G. Quelle: Gu et al. 2003.

die Synthese der Plusstrang-DNA wird durch die Anwesenheit der Uracile beeinträchtigt. Kommt es trotz der Uracile in der Minusstrang-DNA zu einer erfolgreichen Synthese der doppelsträngigen DNA, so entstehen aufgrund der G-zu-A-Hypermutationen im Allgemeinen keine replikationsfähigen Viren (Gu et al. 2003).

Die antiviralen Eigenschaften von Apobec3G können jedoch durch das Vif-Protein blockiert werden, da dieses den Einbau von Apobec3G in die entstehenden Viruspartikel verhindert. Wie Vif dies erreicht, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Neueste Publikationen zeigen, dass Vif eine Ubiquitinierung von Apobec3G bewirkt und damit den Abbau des Proteins im Proteasom induziert (Marin et al. 2003, Sheehy et al. 2003, Yu et al. 2003). Dies könnte erklären, weshalb durch Expression von Vif die Konzentration von Apobec3G in den Zellen um den Faktor 3 reduziert wird. Allerdings findet man in den Viruspartikeln eine viel stärkere Reduktion der Apobec-Menge um den Faktor 140, so dass es neben der Degradation von Apobec3G noch einen weiteren unbekannten Mechanismus geben muss, der den Einbau des antiviralen Proteins in die entstehenden Viruspartikel inhibiert (Mariani et al. 2003). Die genaue Analyse der Funktionen des Vif-Proteins ist Gegenstand aktuellster Forschung.

1.3. Interleukin-2 als wichtiger Faktor für die T-Zellaktivierung

Interleukin-2 (IL-2) wird auch als T-Zell-Wachstumsfaktor bezeichnet, da seine wichtigste Aufgabe in der Aktivierung der klonalen Expansion von T-Zellen nach Antigen-Erkennung besteht. Das Zytokin wird in erster Linie von CD4⁺ T-Lymphozyten und in schwächerem Maße auch von CD8⁺ T-Lymphozyten gebildet und wirkt hauptsächlich in autokriner Weise. Naive T-Zellen, die in den lymphatischen Organen auf dendritische Zellen treffen, die ein passendes Antigen präsentieren, werden aktiviert. Das Zusammenspiel verschiedener intrazellulärer Signalkaskaden, die unten näher beschrieben werden, führt zu einer erhöhten transkriptionellen Aktivität des Interleukin-2-Gens. Die aktivierten T-Zellen beginnen mit der Synthese und Sekretion von IL-2, während gleichzeitig die α -Kette des Interleukin-2-Rezeptors auf der Zelloberfläche verstärkt exprimiert wird. Die Bindung des sekretierten Interleukins-2 an seinen Rezeptor führt nun zu einem starken Konzentrationsanstieg der für die Regulation des Zellzyklus wichtigen Cycline und kann so die Proliferation der antigenspezifischen T-Zellen induzieren (Abbas et al. 2003).

Interleukin-2 wirkt jedoch nicht ausschließlich autokrin, sondern kann auch andere Zellen des Immunsystems beeinflussen. Das Zytokin induziert die Proliferation und Antikörpersynthese von B-Lymphozyten und kann in hohen Konzentrationen auch die zytolytischen Funktionen der natürlichen Killerzellen (NK) verstärken (Wang et al. 2000, Schultz et al. 2001).

Eine weitere Funktion des Interleukins besteht in der Sensibilisierung von T-Zellen für den aktivierungsinduzierten Zelltod (AICD). Wiederholte antigene Stimulation von CD4⁺ T-Zellen in Gegenwart von IL-2 kann zur Apoptose dieser Zellen führen. Dieser Mechanismus spielt vermutlich bei der Termination der Immunantwort eine Rolle. Damit wirkt Interleukin-2 nicht nur immunaktivierend, sondern kann auch die gegensätzliche Funktion erfüllen. Interessanterweise zeigen IL-2-defiziente Mäuse auch keine Immunsuppression, sondern entwickeln eine Autoimmunkrankheit, was die Bedeutung von Interleukin-2 als negativer Regulator autoreaktiver T-Zellen unterstreicht (Nelson 2002).

Im folgenden werden die Signalkaskaden beschrieben, die bei der T-Zellaktivierung unter anderem zur Transkription des Interleukin-2-Gens führen (Abb. 1.6). Wenn der TCR/CD3-Komplex einer T-Zelle an den antigen-präsentierenden MHC-Komplex einer antigen-präsentierenden Zelle (APC) bindet und zusätzlich eine Kostimulation z. B. über CD28 erfolgt, so kommt es zur Aktivierung dieser T-Zelle. Einer der ersten Schritte ist die Autophosphorylierung der Tyrosinkinase Lck, die an den zytoplasmatischen Teil des CD4- bzw. CD8-Oberflächenrezeptors gebunden ist, welcher ebenfalls an den MHC-Komplex der APC bindet. Die aktive Tyrosinkinase phosphoryliert die Tyrosinreste der sogenannten ITAM-

Motive (engl.: „immunoreceptor tyrosine-based activation motif“) in der zytoplasmatischen Domäne der CD3- und ζ -Moleküle. Hier können nun zahlreiche Phosphotyrosin-spezifische Adapter- und Signalmoleküle binden, welche die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden auslösen, darunter die hochkonservierten MAPK-Signalkaskaden, die in Kapitel 1.2.2. bereits beschrieben wurden (Mustelin et al. 2003).

Zwei weitere Signalwege, die bei der T-Zellaktivierung eine wichtige Rolle spielen, werden durch die Phospholipase C (PLC) aktiviert. Das phosphorylierte und damit aktive Enzym katalysiert die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG). IP_3 induziert nun die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum und den Influx von extrazellulärem Ca^{2+} . Dadurch werden Ca^{2+} -abhängige Enzyme wie die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Serin-Phosphatase Calcineurin aktiviert (Hogan et al. 2003). DAG dagegen aktiviert die Proteinkinase C (PKC), die über noch nicht aufgeklärte Mechanismen ebenfalls zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren beiträgt.

Die Aktivierung von T-Zellen führt auch zur Bindung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3K) an den T-Zellrezeptorkomplex. Die PI-3-Kinase phosphoryliert dann membran-assoziierte Inositollipide, wobei aus PIP_2 PIP_3 entsteht. PIP_3 stellt nun eine Bindungsstelle für verschiedene Signalmoleküle dar (Okkenhaug et al. 2003).

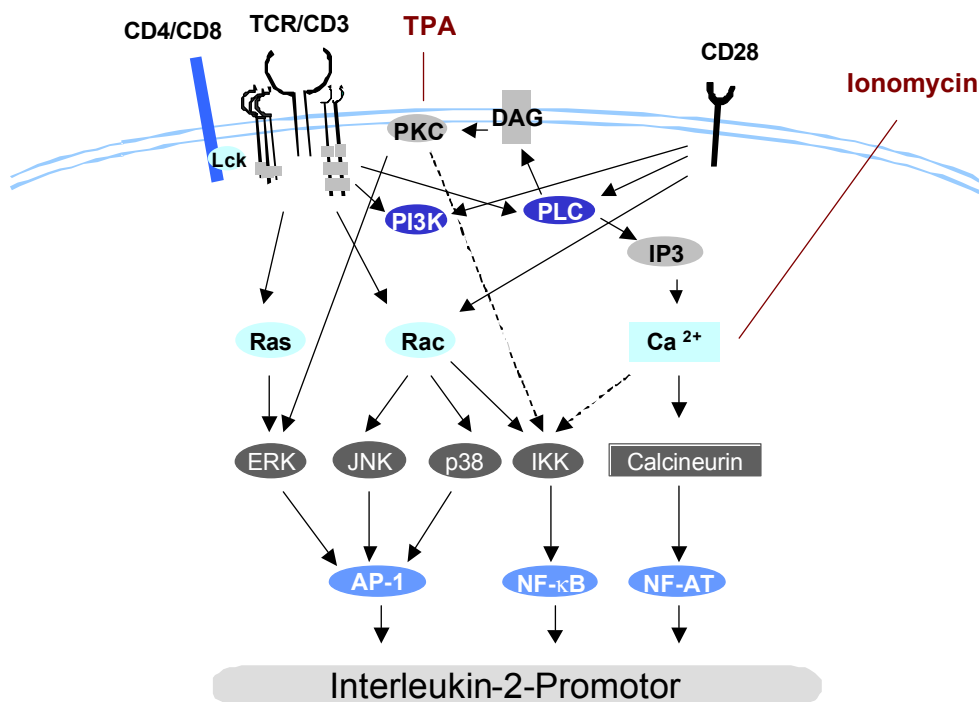


Abbildung 1.6 : Schematische Darstellung der Signalkaskaden, die in aktivierten T-Zellen zur Expression des IL-2-Gens führen.

Die beschriebenen Signalkaskaden führen in erster Linie zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die dann die Expression der Gene induzieren, die in ruhenden T-Zellen nicht transkriptionell aktiv sind. Zu den wichtigsten Transkriptionsfaktoren, die auch an den Promotor des Interleukin-2-Gens binden, gehören dabei NF-AT (engl.: „nuclear factor of activated T cells“), AP-1 (engl.: „activator protein-1“) und NF- κ B (engl.: „nuclear factor κ B“) (Serfling et al. 1995, Jain et al. 1995). Die Transkriptionsfaktoren der NF-AT-Familie werden durch die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Serin-Phosphatase Calcineurin aktiviert. Das Enzym dephosphoryliert die inaktive zytoplasmatische Form des Transkriptionsfaktors, wodurch ein Kernlokalisierungssignal frei wird. Im Zellkern bindet NF-AT vermutlich als Dimer an NF-AT-responsive DNA-Elemente (Hogan et al. 2003). Häufig findet man auch benachbarte NF-AT- und AP-1-Bindungsstellen, an die dann Proteinkomplexe aus NF-AT und AP-1 kooperativ binden (Macian et al. 2001). Die AP-1-Familie umfasst eine große Gruppe von dimeren Transkriptionsfaktoren, die aus Mitgliedern der Jun-, Fos-, Maf- und ATF-Subfamilien gebildet werden. Der wichtige Faktor c-Jun/c-Fos wird in erster Linie durch die Aktivität von MAP-Kinasen reguliert. ERK und PKC induzieren die Transkription des *fos*-Gens, während JNK/SAPK die transkriptionelle Aktivität von c-Jun durch Phosphorylierung verstärkt (Shaulian et al. 2001). NF- κ B wird als Homodimer oder Heterodimer aus Proteinen der Rel-Familie gebildet. Der bekannteste Vertreter besteht aus den Proteinen p50 und p65 und wird in T-Zellen vermutlich durch MAP-Kinasen, Ca^{2+} und PKC aktiviert. Im Zytoplasma liegt der Transkriptionsfaktor im Komplex mit dem Inhibitor I κ B vor. Serin-Phosphorylierung dieses Inhibitors durch die I κ B Kinase (IKK α/β) induziert die Ubiquitinierung und Degradation von I κ B. Dadurch wird ein Kernlokalisierungssignal demaskiert, welches die Translokation des p50/p65-Komplexes in den Zellkern erlaubt (Mercurio et al. 1999, Yamamoto et al. 2004).

Für die Aktivierung einer T-Zelle ist jedoch neben der TCR-vermittelten Signaltransduktion zusätzlich eine Kostimulation notwendig. Ein wichtiger Korezeptor ist CD28, der an Proteine der B7-Familie bindet, die von APC exprimiert werden. Signaltransduktion über CD28 führt zur Induktion der PI-3-Kinase und der Phospholipase C. Zudem kommt es zu einer transkriptionellen Aktivierung des CD28-responsiven Elements (CD28RE), das sich auch im IL-2-Promotor befindet. Die Regulation dieses responsiven Elements ist noch nicht völlig aufgeklärt, aber vermutlich bindet hier ein Transkriptionsfaktorkomplex aus Proteinen der Rel-Familie und der AP-1-Familie (McGuire et al. 1997, Zhou et al. 2002).

In vitro kann die Produktion von IL-2 durch Stimulation von T-Zellen mit TPA und Ionomycin erreicht werden. Dabei wirkt der Phorbol-ester TPA als direkter Aktivator der Proteinkinase C, während das Ca^{2+} -Ionophor Ionomycin die Ca^{2+} -abhängigen Signalwege aktiviert.

1.4. Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Analyse molekularer Mechanismen der Virus/Wirtszellinteraktion im Kontext der Infektion mit Immundefizienzviren. Da Interleukin-2 als wichtiger Faktor der Immunantwort möglicherweise bei der Pathogenese von HIV und SIV eine Rolle spielt, wurde im ersten Teil der Arbeit die Dysregulation dieses Zytokins untersucht. In HIV-1-infizierten T-Zellen wurde eine mit IL-2-Induktion verbundene Immunhyperaktivität bereits in zwei Publikationen beschrieben (Ott et al. 1997, Wu et al. 2001). In der vorliegenden Arbeit sollte nun der Einfluss des apathogenen SIVagm3 auf die IL-2-Genexpression untersucht werden. Um die molekularen Mechanismen zu analysieren, die an der transkriptionellen Aktivierung des IL-2-Promotors durch SIVagm3 beteiligt sind, sollte aufgeklärt werden, welche intrazellulären Signaltransduktionswege beteiligt sind und welche responsiven DNA-Elemente des IL-2-Promotors durch SIVagm3 aktiviert werden. Darüberhinaus sollte eine mögliche Beteiligung des Transaktivator-Proteins Tat untersucht werden, welches im Falle von HIV-1 zur IL-2-Induktion beiträgt (Ott et al. 1997). Aufgrund der publizierten Beobachtung, dass HIV-1-Tat nur in aktivierten Zellen die IL-2-Expression verstärken kann, sowie neuerer Forschungsergebnisse, welche die Bedeutung der Phosphorylierung viraler Proteine, wie Vif und p6(Gag) zeigen (Yang et al. 1998, Hemonnot et al. 2004), sollte untersucht werden, ob es sich bei Tat um ein Phosphoprotein handelt, das möglicherweise durch Kinasen der MAPK-Familie reguliert wird.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten die Interaktionen intrazellulärer MAPK-Signalkaskaden mit dem antiviralen Protein Apobec3G, das durch Vif degradiert wird, untersucht werden. Da über die Regulation von Apobec3G bislang wenig bekannt ist, sollte zunächst analysiert werden, ob spezifische Signalwege, die für die Zellaktivierung notwendig sind, die Apobec3G-Expression in der Zelle verändern oder eine Phosphorylierung des Proteins induzieren. Um neue Erkenntnisse über die funktionalen Eigenschaften des Vif-Proteins zu gewinnen, sollte zudem gezeigt werden, ob Vif und Apobec3G assoziiert sind und ob es neben der Apobec3G-Degradation weitere Strategien gibt, durch die Vif den Einbau des antiviralen Proteins in die Viruspartikel verhindert.

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1. Methoden der Molekularbiologie

2.1.1. Verwendete Plasmide

Reporterplasmide:

IL-2-luc: der humane proximale Interleukin-2-Promotor/Enhancer wurde über die Restriktionsschnittstellen *Sma* I und *Bgl* II in das Reporterplasmid pGL3-basic (Promega, Mannheim) eingefügt. Das Plasmid wurde von A. Avots und A. Hofmeyer, Universität Würzburg, zur Verfügung gestellt (Avots et al. 1997).

NF-AT-luc: enthält vier NF-AT-responsive Elemente und eine TATA-Box, die die Expression des Luciferase-Gens kontrollieren (PathDetect NF-AT cis-Reporting System, Stratagene, La Jolla, USA).

NF- κ B-luc: enthält drei Kopien des NF- κ B-responsiven Elements und einen minimalen Tymidinkinasepromotor vor einem Luciferase-Reportergen. Dieses Plasmid wurde von T. Wirth, Universität Würzburg konstruiert.

AP-1-luc: enthält vier AP-1-Bindungsstellen, die mit dem β -Globin-Promotor die Luciferaseexpression kontrollieren. Das Plasmid wurde von A. Hofmeyer, Universität Würzburg, zur Verfügung gestellt.

CD28/AP-1-luc: enthält drei Kopien des CD28/AP-1-responsiven Elements des IL-2-Promotors, die in pGL3-Promotor (Promega, Mannheim) inseriert wurden. Das Plasmid wurde von A. August, Pennsylvania State University, USA, zur Verfügung gestellt (Tao et al. 2003).

pGL3-enhancer-NL4-3-LTR-luc: die LTR-Region von HIV-1(NL4-3) einschließlich der TAR-Region wurde über die Restriktionsschnittstellen *Hind* III und *Not* I in pGL3-enhancer (Promega, Mannheim) inseriert. Das Plasmid wurde von M. Mühlebach (PEI) konstruiert.

pGL3-enhancer-PBj1.9-LTR-luc: die LTR-Region von SIVsmm(PBj1.9) einschließlich der TAR-Region wurde über die Restriktionsschnittstellen *Hind* III und *Not* I in pGL3-enhancer (Promega, Mannheim) inseriert. Das Plasmid wurde von M. Mühlebach (PEI) konstruiert.

pGL3-enhancer-agm3-LTR-luc: die LTR-Region von SIVagm3 einschließlich der TAR-Region wurde über die Restriktionsschnittstellen *Hind* III und *Not* I in pGL3-enhancer (Promega, Mannheim) inseriert. Das Plasmid wurde von M. Mühlebach (PEI) konstruiert.

Expressionsplasmide:

pBS-kRSPA: Expressionsplasmid für eukaryontische Zellen. Es enthält einen Rous-Sarkom-Virus-Promotor und ein SV40-Polyadenylierungssignal im pBluescript-Vektor (Stratagene, La Jolla, USA). Das Plasmid wurde von D. Derse, National Cancer Institute/National Health Institute, MD, USA, zur Verfügung gestellt.

pBS-kRSPA-HA-Tat_{SIVagm3}: Expressionsplasmid für das vollständige Tat-Protein von SIVagm3 mit HA-Tag. Ausgehend von dem Vollängenplasmid des SIVagm3 (GenBank Accession Nr. M30931) wurden die beiden Tat-Exons (Positionen 5554-5771/8013-8154) durch PCR amplifiziert. Dabei wurde über die Primer am 5'-Ende eine *Xho* I-Schnittstelle und ein HA-Tag, am 3'-Ende eine *Spe* I-Schnittstelle eingefügt. Durch Fusions-PCR wurden die beiden Exons vereinigt und über die Restriktionsschnittstellen in das Expressionsplasmid pBS-kRSPA inseriert.

pBS-kRSPA-Tat_{SIVagm3}: Expressionsplasmid für das vollständige Tat-Protein von SIVagm3. Die Konstruktion wurde wie bei pBS-kRSPA-HA-Tat_{SIVagm3} durchgeführt, allerdings wurde kein HA-Tag eingefügt.

pBS-kRSPA-HA-Tat_{NL4-3}: Expressionsplasmid für das vollständige Tat-Protein von HIV-1(NL4-3) mit HA-Tag. Das Vollängenplasmid pNL4-3 (GenBank Accession Nr. AF324493) wurde als Ausgangsplasmid für die Konstruktion der beiden Tat-Exons (Positionen 5830-6044/8369-8414) verwendet. Die Konstruktion erfolgte analog der pBS-kRSPA-HA-Tat_{SIVagm3}-Konstruktion.

pBS-kRSPA-Tat_{NL4-3}: Expressionsplasmid für das vollständige Tat-Protein von HIV-1(NL4-3). Die Konstruktion wurde wie bei pBS-kRSPA-HA-Tat_{NL4-3} durchgeführt, allerdings wurde kein HA-Tag eingefügt.

pBS-kRSPA-HA-Tat_{HIV2BEN}: Expressionsplasmid für das vollständige Tat-Protein von HIV-2(BEN) mit HA-Tag. Das Vollängenplasmid des HIV-2(BEN) (GenBank Accession Nr. M30502) wurde als Ausgangsplasmid für die Konstruktion der beiden Tat-Exons (Positionen 6402-6697/8861-8957) verwendet. Die Konstruktion erfolgte analog der pBS-kRSPA-HA-Tat_{SIVagm3}-Konstruktion.

pGEX-6P-2-Tat_{SIVagm3}: Plasmid für die Expression eines GST-Tat_{SIVagm3}-Fusionsproteins in Bakterien. Das Tat-Insert von pBS-kRSPA-Tat_{SIVagm3} wurde mittels PCR amplifiziert, wobei über die Primer die Restriktionsschnittstellen *Bam*H I und *Eco*R I eingefügt wurden. Das Fragment wurde dann in pGEX-6P-2, ein Plasmid, das für die Expression von GST (Glutathion-S-Transferase)-Fusionproteinen in Bakterien verwendet wird, inseriert.

pcDNA3.1-HA-CEM15: Expressionsplasmid für HA-markiertes Apobec3G. Apobec3G wurde über die Restriktionsschnittstellen *Eco*R I und *Xho* I in das Plasmid pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, USA) inseriert (Mariani et al. 2003).

Volllängenplasmide:

SIVagm3: Kodiert für die Volllängensequenz des simianen Immundefizienzvirus der Afrikanischen Grünen Meerkatze (Baier et al. 1990, GenBank Accession Nr. M30931).

HIV-1(NL4-3): Kodiert für die Volllängensequenz des humanen Immundefizienzvirus HIV-1(NL4-3) (Adachi et al. 1996, GenBank Accession Nr. AF324493).

NL4-3-luc: Ausgehend von pNL4-3 (GenBank Accession Nr. M19921) wurden Frameshift-Mutationen in den *env*- und *vpr*-Genen eingefügt. Ein Firefly-Luciferasegen wurde in die *nef*-Region eingefügt (Connor et al. 1995).

NL4-3-luc Δ vif: Dieses Plasmid basiert auf NL4-3-luc, zusätzlich wurde eine Frameshift-Mutation im *vif*-Gen eingefügt (Mariani et al. 2003).

2.1.2. Oligonukleotide

Die verwendeten Primer wurden von der Firma MWG (Ebersberg) bezogen und auf eine Standardkonzentration von 100 pmol/ μ l eingestellt.

Konstruktion von pBS-kRSPA-HA-Tat_{SIVagm3}:

5ÜXho1HA-Tag-Tat1Plu:	5'-GCA TGC TCG AGA TGT ATC CAT ATG ATG TTC CAG ATT ATG CTG ACA AGG GGG AGG ACG-3'
Tat1MinusLang:	5'-TGT TTT TGT TCA GGA AAG CGA TCA AGC GGA-3'
15FTat2Plus:	5'-TCC TGA ACA AAA ACA ATC CAT ATC CAC CCG TGG-3'
5ÜSpe1Tat2Minus:	5'-GAC GTA CTA GTT CAA TCG CTT GCA CCA GTT G-3'

Konstruktion von pBS-kRSPA-Tat_{SIVagm3}:

5ÜXhoTat1Plus:	5'-GCA TGC TCG AGA TGG ACA AGG GGG AGG ACG-3'
Tat1Minus:	5'-TGT TTT TGT TCA GGA AAG C-3'
15FTat2Plus:	5'-TCC TGA ACA AAA ACA ATC CAT ATC CAC CCG TGG-3'
5ÜSpe1Tat2Minus:	5'-GAC GTA CTA GTT CAA TCG CTT GCA CCA GTT G-3'

Konstruktion von pBS-kRSPA-HA-Tat_{NL4-3}:

5ÜXhoHA-HIV-Tat1Plus:	5'-GCA TGC TCG AGA TGT ATC CAT ATG ATG TTC CAG ATT ATG CTG AGC CAG TAG ATC CTA G-3'
HIV-Tat1Minus:	5'-TGC TTT GAT AGA GAA GCT TGA TG-3'
15FHIV-Tat2Plus:	5'-TTC TCT ATC AAA GCA ACC CAC CTC CCA ATC CCG-3'
5ÜSpe1HIV-Tat2Minus:	5'-GAC GTA CTA GTC TAT TCC TTC GGG CCT GTC-3'

Konstruktion von pBS-kRSPA-Tat_{NL4-3}:

5'Xho1HIV-Tat1Plus: 5'-GCA TGC TCG AGA TGG AGC CAG TAG ATC CTA G-3'
 HIV-Tat1Minus: 5'-TGC TTT GAT AGA GAA GCT TGA TG-3'
 15FHIV-Tat2Plus: 5'-TTC TCT ATC AAA GCA ACC CAC CTC CCA ATC CCG-3'
 5'ÜSpe1HIV-Tat2Minus: 5'-GAC GTA CTA GTC TAT TCC TTC GGG CCT GTC-3'

Konstruktion von pBS-kRSPA-HA-Tat_{HIV2BEN}:

XhoHAHIV2Btat1+: 5'-GCA TGC TCG AGA TGT ATC CAT ATG ATG TTC CAG
 ATT ATG CTG AGA CAC CCT TGA AGG-3'
 HIV2BENTat1minus: 5'-TTG TCT GGT GCA GAA GGC G-3'
 15FHIV2BENTat2+: 5'-TTC TGC ACC AGA CAA ATC CAT ATC CAC AAG GAC-3'
 Spe1HIV2BENTat2: 5'-GAC GTA CTA GTT TAT TGG CCA AGG CCA CAA GTC-3'

Konstruktion von pGEX-6P-2-Tat_{SIVagm3}:

5'ÜBamH1-SIVTat+: 5'-GCA TGG GAT CCG ACA AGG GGG AGG ACG-3'
 5'ÜEcoR1-SIVTat: 5'-GAC GTG AAT TCT CAA TCG CTT GCA CCA G-3'

Nachweis IL-2-mRNA durch RT-PCR:

IL-2plus: 5'-TCA ACT CCT GCC ACA ATG T-3'
 IL-2minus: 5'-AGT CCC TGG GTC TTA AGT GAA-3'
 IL2nest_plus: 5'-TGC TGG ATT TAC AGA TGA T-3'
 IL2nest_minus: 5'-ATT TAG CAC TTC CTC CAG A-3'

2.1.3. Herstellung kompetenter Bakterien (CaCl₂-Methode)

Der jeweilige Bakterienstamm wurde in 5 ml LB-Medium ohne Antibiotikum angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Tag wurden je 2,5 ml der Übernachtskultur in 100 ml LB-Medium gegeben und bei 37°C im Schüttler inkubiert, bis eine optische Dichte bei 550 nm (OD₅₅₀) von etwa 0,5 erreicht war (Gene Quant RNA/DNA Calculator, Amersham, Buckinghamshire, UK). Die Kulturen wurden für 5 min. auf Eis gestellt und anschließend in zwei 50 ml-Röhrchen pelletiert (4500 rpm, 4°C, 10 min., Varifuge RF, Heraeus Sepatech, Osterode). Die Pellets wurden in je 20 ml TFB1-Puffer resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 min. auf Eis wurden die Zellen unter den gleichen Bedingungen abzentrifugiert und die Pellets in je 2 ml TFB2-Puffer gelöst. Anschließend wurden die Bakterien für 15 min. auf Eis gestellt, aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

LB-Medium (PEI):

Bacto-Trypton	10 g/l
Bacto-Hefeextrakt	10 g/l
NaCl	10 g/l

TFB1-Puffer:

CH ₃ COOK	30 mM	(Merck, Darmstadt)
RbCl	100 mM	(Merck, Darmstadt)
CaCl ₂ /2H ₂ O	10 mM	(PEI)
MnCl ₂ /4H ₂ O	50 mM	(Merck, Darmstadt)
Glycerin	15 % (v/v)	(Fluka, Steinheim)
mit Essigsäure auf pH 5,8 eingestellt und sterilfiltriert		

TFB2-Puffer:

MOPS	10 mM	(Serva, Heidelberg)
CaCl ₂	75 mM	(PEI)
RbCl	10 mM	(Merck, Darmstadt)
Glycerin	15 % (v/v)	(Fluka, Steinheim)
mit KOH auf pH 6,5 eingestellt und sterilfiltriert		

2.1.4. Transformation von kompetenten Bakterien

Die kompetenten Bakterien wurden langsam auf Eis aufgetaut. Dann wurden 50 ng Plasmid-DNA auf 100 µl Bakterien gegeben und vorsichtig vermischt. Nach 1 h Inkubation auf Eis wurden die Zellen für 60 sec. in ein 42°C-Wasserbad und anschließend sofort wieder auf Eis gestellt. Die Bakterien wurden in 1 ml S.O.C.-Medium (Gibco Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA) ohne Antibiotikum gegeben und für 90 min. bei 37°C geschüttelt. Dann wurden die Bakterien abzentrifugiert (4500 rpm, 4°C, 10 min., Varifuge RF, Heraeus Sepatech, Osterode), in ca. 100 µl des Überstands resuspendiert und auf einer LB-Ampicillin-Platte (LB-Agar mit 50 µg/ml Ampicillin) ausgestrichen. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C oder 2 Tage bei Raumtemperatur konnten Kolonien von der Platte gepickt und zum Animpfen von Bakterienkulturen verwendet werden.

2.1.5. Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde zunächst eine Bakterienkultur angeimpft. Dazu wurde entweder ein Bakterienklon von einer Agarplatte gepickt oder etwas Bakterienmaterial mit einer Impföse von einem eingefrorenen Glycerin-Stock entnommen und in 200 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin gegeben. Die Bakterienkultur wurde über Nacht bei 37°C oder für zwei Tage bei 25°C im Bakterenschüttler inkubiert.

Aus der dichtgewachsenen Bakteriensuspension wurden dann die Plasmide isoliert. Die Aufreinigung erfolgte unter Verwendung des QIAGEN Plasmid Purification Kits (QIAGEN, Hilden) nach dem Protokoll für die Maxi-DNA-Präparation. Nach Beendigung der Aufreinigung wurde das DNA-Pellet in 200-500 µl H₂O gelöst und die DNA-Konzentration bestimmt. Die Plasmid-DNA wurde bei -20°C eingefroren. Im Falle von neuklonierten Plasmiden wurde das Insert durch Sequenzierung überprüft (SEQLAB, Göttingen).

Zur Lagerung von transformierten Bakterien wurden Glycerin-Stocks hergestellt, indem 1 ml der dichtgewachsenen Bakterienkultur mit 200 µl Glycerin gut gemischt und anschließend sofort bei -80°C eingefroren wurden.

2.1.6. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die aromatischen Ringe der Basen von Nukleinsäuren absorbieren UV-Licht der Wellenlänge 260 nm. Daher kann die Konzentration einer DNA- oder RNA-Lösung durch photometrische Messung bestimmt werden. Die Absorption wurde in einer Quarzküvette im Photometer (Gene Quant RNA/DNA Calculator, Amersham, Buckinghamshire, UK) gemessen. Bei einer Küvetten-Schichtdicke von 1 cm entspricht eine OD₂₆₀ von 1 einer DNA-Konzentration (dsDNA) von 50 µg/ml bzw. einer RNA-Konzentration (ssRNA) von 33 µg/ml. Da das Absorptionsmaximum der aromatischen Aminosäurereste der Proteine bei 280 nm liegt, kann aus dem Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ die Reinheit der Nukleinsäurelösung abgeschätzt werden. Eine reine DNA-Lösung besitzt einen OD₂₆₀/OD₂₈₀-Wert von 1,8, eine reine RNA-Lösung einen OD₂₆₀/OD₂₈₀-Wert von 2.

2.1.7. Restriktion von Plasmid-DNA

Alle Restriktionen wurden mit den Restriktionsendonucleasen der Firma New England BioLabs (NEB, Schwalbach) und nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Für einen analytischen Verdau wurden 0,5-1 µg DNA eingesetzt und die Reaktion erfolgte in einem Volumen von 30 µl. Für einen präparativen Verdau wurden bis zu 10 µg DNA in einem

Volumen von 50-100 µl eingesetzt. Anschließend wurde die Restriktion durch eine Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

2.1.8. Agarose-Gelelektrophorese

Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden Agarosegele mit einem Agaroseanteil von 0,7-2 % verwendet. Die Agarose wurde in TAE-Puffer aufgekocht und mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (Roth, Karlsruhe) versetzt, anschließend wurde das Gel in eine Flachbettgelkammer gegossen. Zur Probenvorbereitung wurden die DNA-Proben mit sechsfach konzentriertem Probenpuffer gemischt und dann auf das Agarosegel aufgetragen. Als Größenmarker wurden die 100 bp DNA ladder und 1kb DNA ladder (NEB, Schwalbach) eingesetzt. Die Elektrophorese lief ca. 1-2 h bei 70-120 V Gleichstrom, dann wurden die DNA-Banden im UV-Licht analysiert.

PCR-Ansätze oder Restriktionsansätze für Klonierungen wurden im Agarosegel aufgetrennt und die gewünschten Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Isolation der DNA aus der Agarose erfolgte mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden) oder mit JetSorb (Genomed, Bad Oeynhausen) nach den Angaben der Hersteller.

6x-Agarosegel-Probenpuffer:

Glycerin	33 % (v/v)	(Fluka, Steinheim)
Bromphenolblau	0,25 % (w/v)	(Sigma, Taufkirchen)

100 bp oder 1kb DNA ladder (gebrauchsfertig, 50 µg/ml):

DNA ladder (500 µg/ml)	100 µl	(NEB)
Bromphenolblau 5 %	5 µl	(Sigma, Taufkirchen)
Glycerin	100 µl	(Fluka, Steinheim)
H ₂ O bidest.	795 µl	

TAE-Puffer pH 8,0:

Tris-Acetat	40 mM	(Merck, Darmstadt)
EDTA	1 mM	(PEI)

2.1.9. Ligation

Für Ligationen wurde die T4-DNA-Ligase von NEB (Schwalbach) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Das molare Verhältnis von Vektor zu Insert betrug 1:3, wobei

zwischen 200 und 500 ng des Vektors in einem Gesamtvolumen von 15 µl eingesetzt wurden. Die Reaktion erfolgte bei 16°C im Heizblock über Nacht. Die Hälfte des Ligationsansatzes wurde dann für die Transformation in kompetente Bakterien eingesetzt.

2.1.10. Präparation von Total-RNA und Herstellung von cDNA

Zur Isolierung von Total-RNA aus eukaryontischen Zellen wurde das RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden) verwendet. Je Ansatz wurden $1-3 \times 10^6$ A3.01-Zellen eingesetzt. Die RNA wurde nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt und mit 40 µl H₂O eluiert. Anschließend wurde die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

Um die Proben von Verunreinigungen mit genomischer DNA zu befreien, wurde ein DNase I-Verdau durchgeführt. Dazu wurden die RNA-Proben nach der Aufreinigung mit der RQ1 RNase-Free DNase (Promega, Mannheim) behandelt oder der DNA-Verdau erfolgte während der RNA-Aufreinigung unter Verwendung des RNase-Free DNase Set (QIAGEN, Hilden). Beide Methoden wurden nach den Angaben der Hersteller durchgeführt.

Für die reverse Transkription von RNA in cDNA wurde das SUPERScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, USA) verwendet. Die RT-Reaktion wurde unter Verwendung von Oligo(dT)-Primern nach dem angegebenen Protokoll durchgeführt. Dabei wurden je Ansatz 1,6 µg RNA in die Reaktion gegeben. Die resultierende cDNA wurde bei -20°C eingefroren und später für eine PCR eingesetzt.

2.1.11. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Amplifizierung der Tat-Exons aus den Vollängenplasmiden:

Für die Amplifizierung der Exons des Tat-Proteins aus den Vollängenplasmiden von SIVagm3, HIV-1(NL4-3) und HIV-2(BEN) wurde das Expand High Fidelity PCR System (Roche, Mannheim) verwendet. Dabei wurde eine Mischung aus der *Taq* DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* und der *Pwo* DNA Polymerase aus *Pyrococcus woesei* eingesetzt. Da die *Pwo* DNA-Polymerase eine 3'-5'-Exonucleasefunktion enthält, die falsch eingebaute Nucleotide erkennt und entfernt, ist die Fehlerrate bei diesem PCR-System besonders gering. Die Desoxynukleotide wurden von NEB (Schwalbach) bezogen. Es wurde eine Stammlösung angesetzt, die je 10 mM dATP, dCTP, dTTP und dGTP enthielt. Die PCR-Ansätze wurden in dünnwandigen PCR-Reaktionsgefäßen auf Eis angesetzt.

<i>Standardansatz von 100 µl:</i>	200 mM je Desoxynucleotid
	100 ng Plasmid-DNA
	100 pmol Plus-Primer
	100 pmol Minus-Primer
	10 µl PCR Puffer mit MgCl ₂
	0,75 µl Enzym-Lösung (2,6 units)
	ad 100 µl H ₂ O bidest.

Für die Durchführung der PCR in dem Thermocycler (PTC-200, MJ Research) wurden folgende Bedingungen gewählt:

Denaturierung:	94°C	3 min.	
Denaturierung:	94°C	45 sec.	} 35x
Primer-Annealing:	55°C	45 sec.	
Primer-Extension:	68°C	45 sec.	
Primer-Extension:	68°C	10 min.	
	4°C	unendlich	

Fusions-PCR zur Fusion der beiden Exons des *tat*-Gens:

Mithilfe der Fusions-PCR ist es möglich, mehrere DNA-Fragmente ohne Verwendung von Restriktionsendonucleasen miteinander zu verbinden. Um die beiden *tat*-Exons fusionieren zu können, wurde bei der Amplifizierung des zweiten Exons ein Plus-Primer mit 15 Nukleotiden Überhang verwendet, die homolog zu den letzten 15 Nukleotiden des ersten Exons waren. Die beiden Exons wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, aus dem Agarosegel extrahiert und in äquimolaren Mengen in der Fusions-PCR eingesetzt. Dabei wurden die ersten 10 Zyklen ohne Primer durchgeführt, um die Bildung des Fusionsfragments zu ermöglichen. Anschließend wurden die äußeren Primer (Plusprimer des ersten Exons, Minusprimer des zweiten Exons) für weitere 30 Zyklen dazugegeben. Für diese PCR wurde ebenfalls das Expand High Fidelity PCR System (Roche, Mannheim) eingesetzt.

Denaturierung:	94°C	3 min.	
Denaturierung:	94°C	45 sec.	} 10x ohne Primer, 30x mit Primer
Primer-Annealing:	58°C	45 sec.	
Primer-Extension:	68°C	60 sec.	
Primer-Extension:	68°C	10 min.	
	4°C	unendlich	

Amplifizierung des SIVagm3-Tat-Inserts aus pBS-kRSPA-HA-Tat_{SIVagm3} zur Umklonierung in pGEX-6P:

Für die Umklonierung des Inserts aus pBS-kRSPA-HA-Tat_{SIVagm3} in pGEX-6P wurden die AmpliTaq Gold und der 10x PCR Buffer II (Applied Biosystems, Foster City, USA) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Da die AmpliTaq Gold erst durch Hitze aktiviert wird, erfolgte vor der eigentlichen PCR eine 10-minütige Erhitzung auf 94°C. Folgende Zyklen wurden gewählt:

Denaturierung:	94°C	10 min.	
Denaturierung:	94°C	45 sec.	} 35x
Primer-Annealing:	58°C	45 sec.	
Primer-Extension:	68°C	60 sec.	
Primer-Extension:	68°C	10 min.	
	4°C	unendlich	

nested PCR zum Nachweis von IL-2-mRNA:

Die nested PCR ist besonders sensitiv, da hier mit dem Produkt einer ersten PCR-Reaktion unter Verwendung eines inneren Primer-Paars eine zweite PCR-Reaktion durchgeführt wird. Für die erste PCR mit den äußeren Primern (IL-2plus, IL-2minus) wurden je 3 µl cDNA (siehe Kapitel 2.1.10.) eingesetzt. Dabei wurde die AmpliTaq Gold und der 10x PCR Buffer II (Applied Biosystems, Foster City, USA) verwendet. Folgende Zyklen wurden gewählt:

Denaturierung:	94°C	10 min.	
Denaturierung:	94°C	45 sec.	} 34x
Primer-Annealing:	58°C	45 sec.	
Primer-Extension:	72°C	45 sec.	
Primer-Extension:	72°C	6 min.	
	4°C	unendlich	

Je 2 µl des 1. PCR-Produkts wurden in einer zweiten PCR mit den inneren Primern (IL2nest_plus, IL2nest_minus) eingesetzt. Die PCR wurde analog der ersten PCR mit den gleichen Zyklen durchgeführt.

2.2. Methoden der Zellbiologie

2.2.1. Verwendete Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden verwendet:

- A3.01: humane CD4⁺ T-Zelllinie (Folks et al. 1985)
293T: humane embryonale Nierenzelllinie, transformiert durch großes T-Antigen von SV 40 (DuBridge et al. 1997)
NIH3T3: murine embryonale Fibroblastenzelllinie (Jainchill et al. 1969)
CV-1: simiane Nierenzelllinie der Afrikanischen Grünen Meerkatze (Jensen et al. 1964)
COS-7: aus CV-1 entstanden, transformiert durch T-Antigen von SV 40 (Gluzman et al. 1981)

2.2.2. Kultivierung von Zelllinien

A3.01-Zellen wurden in RPMI-1640-Medium (PEI) mit 10 % hitzeinaktiviertem FKS (fötales Kälberserum, Biochrom KG, Berlin, 40 min. bei 56°C inaktiviert), 2 mM L-Glutamin (Biochrom KG, Berlin), 50 µg/ml Streptomycin (Biochrom KG, Berlin) und 100 Einheiten/ml Penicillin (Biochrom KG, Berlin) in einem Zellinkubator (37°C, 5 % CO₂, 80 % gesättigte Wasserdampfatosphäre, Cytoperm, Heraeus, Osterode) kultiviert. Zweimal pro Woche, bei einer Dichte von etwa 1x10⁶ Zellen/ml, wurden die Zellen im Verhältnis 1:20 gesplittet.

Adhärente Zellen wurden in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium, PEI) mit 10 % hitzeinaktiviertem FKS, 2 mM L-Glutamin, 50 µg/ml Streptomycin und 100 Einheiten/ml Penicillin in einem Zellinkubator kultiviert. Zweimal pro Woche wurden die konfluenten Zellen im Verhältnis 1:10 gesplittet.

Zur Lagerung von Zellen in flüssigem Stickstoff, wurden je 1x10⁶ Zellen pelletiert (1100 rpm, 4°C, 5 min., Varifuge K, Heraeus, Osterode) und in 1,5 ml kaltem FKS mit 10 % DMSO (Merck, Darmstadt) resuspendiert. Die Zellen wurden in einem vorgekühlten 2 ml-Kryoröhrchen zunächst 24 h bei -80°C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Um neue Zellen aufzutauen, wurden diese aus der Stickstofflagerung in ein 37°C-Wasserbad gegeben und sofort nach dem Auftauen in 15 ml raumtemperiertes Medium überführt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (1100 rpm, RT, 5 min., Varifuge K, Heraeus, Osterode) und in 15 ml Medium resuspendiert. Nach erneutem Abzentrifugieren wurden die Zellen in 20 ml Medium resuspendiert und in einer Zellkulturflasche kultiviert.

2.2.3. Aufreinigung primärer mononukleärer Zellen aus peripherem Blut

Zur Gewinnung primärer mononukleärer Zellen des peripheren Bluts (PBMC) wurde Vollblut ohne Plasma vom Blutspendedienst des DRK, Frankfurt/Main bezogen. Die PBMC wurden durch Dichtegradientenzentrifugation über einen Ficoll-Gradienten isoliert. Dazu wurden je 20 ml 1:1 in PBS verdünntes Vollblut in einem 50 ml-Röhrchen über 15 ml Ficoll Histopaque (Sigma, Taufkirchen) geschichtet. Bei der anschließenden Zentrifugation (1000 rpm, RT, 20 min., ohne Bremse, Varifuge K, Heraeus, Osterode) bildeten Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen einen Ring über dem Ficoll, während sich Erythrozyten und Granulozyten aufgrund ihrer höheren Dichte am Boden des Röhrchens sammelten. Der Lymphozytenring mit den PBMC wurde abgenommen, in ein neues Röhrchen überführt und zweimal mit PBS gewaschen. Um die restlichen Erythrozyten zu entfernen, wurden die Zellen in 0,86 % Ammoniumchlorid (PEI) inkubiert (15 min., 37°C) und erneut zweimal in PBS gewaschen. Die isolierten PBMC wurden dann in RPMI-Vollmedium mit 20 % FKS aufgenommen.

Zur Entfernung der Monozyten und Makrophagen aus den PBMC wurden die Zellen über Nacht in einer Zellkulturflasche im Zellinkubator inkubiert. In dieser Zeit adhärten Monozyten und Makrophagen und die peripheren Blutlymphozyten (PBL) konnten mit dem Medium abgenommen werden.

Zur Depletion der CD8⁺ T-Lymphozyten aus den PBMC wurden die Zellen nach der Isolation nicht in RPMI, sondern in MACS-Waschpuffer aufgenommen. Die Depletion der CD8⁺ T-Lymphozyten erfolgte über magnetische Zellsortierung (MACS) mithilfe der CD8 MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) nach den Angaben des Herstellers.

MACS Waschpuffer:

BSA	0,5 % (w/v)	(AppliChem, Darmstadt)
EDTA	2 mM	(PEI)
in PBS		(PEI)

PBS (PEI):

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM
Na ₂ HPO ₄	8,1 mM

2.2.4. Zellstimuli und Inhibitoren

Stimulation von primären T-Lymphozyten:

Zur Aktivierung von CD8-depletierten PBMC wurden 0,2 µg/ml PHA (Murex Diagnostics, Dartford, UK) und 10 ng/ml IL-2 (entspricht 180 IE, Proleukin, EuroCetus, Frankfurt) in das Medium gegeben.

Für eine suboptimale Stimulation wurden 1 µg/ml α -CD3 (PEI) und 1 µg/ml α -CD28 (Pharmingen, San Diego, USA) in das Medium gegeben. Die Restimulation erfolgte mit den gleichen Antikörper-Konzentrationen.

Stimulation von Zelllinien:

Um Zelllinien zu aktivieren, wurden 20 ng/ml TPA (Sigma, Taufkirchen) und 0,5 µM Ionomycin (Sigma, Taufkirchen) für 6-15 h auf die Zellen gegeben.

Zur Aktivierung der MAPK ERK wurden die Zellen für 10-30 min. mit 100 ng/ml TPA stimuliert. JNK/SAPK wurde durch 30-minütige Behandlung mit 100 ng/ml TPA und 0,5 µM Ionomycin aktiviert. Zur Aktivierung von p38 wurden 100 ng/ml TPA, 0,5 µM Ionomycin und 10 µg/ml Anisomycin (Sigma, Taufkirchen) für 30 min. zugegeben.

Eingesetzte Inhibitoren:

Inhibitor	Quelle	Stammlösung	Endkonzentration
MEK-Inhibitor U0126	Promega, Mannheim	10 mM	10-40 µM
p38-Inhibitor SB203580	Promega, Mannheim	10 mM	10-40 µM
JNK-Inhibitor SP600125	Calbiochem, Cambridge, UK	18 mM	10-40 µM
Cyclosporin A	Sigma, Taufkirchen	10 mg/ml	15-300 ng/ml
ALLN	Calbiochem, Cambridge, UK	20 µg/µl	50 µM
Staurosporin	Calbiochem, Cambridge, UK	5 µg/µl	40 nM
Gö6983	Calbiochem, Cambridge, UK	10 µg/µl	1 µM
Gö6976	Calbiochem, Cambridge, UK	5 µg/µl	1 µM

Alle Inhibitoren wurden in DMSO angesetzt und bei –20°C gelagert.

2.2.5. Transiente Transfektion von Suspensionszellen

Zur Transfektion von Suspensionszellen wurde das Transfektionsreagenz DMRIE-C (Gibco Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA) eingesetzt, welches das Lipid DMRIE (1,2-dimyristyloxypropyl-3-dimethyl-hydroxyethyl-ammoniumbromid) und Cholesterol zu gleichen

Teilen enthält. Die Lipide bilden mit der zu transfizierenden DNA Komplexe, die von der Zelle aufgenommen werden können.

Um A3.01-Zellen zu transfizieren, wurden diese am Vortag in frisches Medium gegeben. Je Ansatz wurden 0,5 ml OPTI-MEM1 (Gibco Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA) mit 3,5 µl DMRIE-C gemischt und in eine 6-Loch-Platte gegeben. Dann wurden 0,5 µg-1,5 µg Plasmid-DNA in 0,5 ml OPTI-MEM1 verdünnt und zugegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden je 5×10^5 Zellen in 0,5 ml serumfreiem Medium zugegeben. Die Transfektionsansätze wurden 45 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert, anschließend wurden je 1,5 ml RPMI-Vollmedium zugegeben.

2.2.6. Transiente Transfektion von adhärenenten Zellen

Adhärenente Zellen wurden mit LipofectAMINE Plus (Invitrogen, Carlsbad, USA) transfiziert. Dazu wurden in einer 6-Loch-Platte je 8×10^5 Zellen ausgesät, so dass die Zellen am nächsten Tag zu 80 % konfluent waren. 1-3 µg DNA wurden in ein Polystyrolröhrchen gegeben und mit 100 µl OPTI-MEM1 (Gibco Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA) verdünnt. Nach Zugabe von 6 µl PLUS-Reagenz folgte eine Inkubation für 15 min. bei Raumtemperatur. Dann wurden je 100 µl OPTI-MEM1 mit 5 µl LipofectAMINE zugegeben und die Ansätze wurden wieder für 15 min. inkubiert. Während der Inkubationszeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen, dann wurden je 800 µl OPTI-MEM1 auf die Zellen gegeben. In jedes 6-well wurden 200 µl der DNA-Lipid-Komplexe gegeben und die Zellen wurden für 4 h im Zellinkubator inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in PBS gewaschen, dann wurden 3 ml DMEM-Vollmedium zugegeben.

2.2.7. Transfektion von primären Zellen

Zur Transfektion von PBL wurde der Nukleofektor (Amaxa Biosystems, Köln) eingesetzt. Mithilfe dieser Elektroporationstechnik ist es möglich, DNA direkt in den Zellkern zu transfizieren. Die unstimulierten PBL wurden innerhalb von 24 h nach der Aufreinigung mit dem „Human T cell Nukleofektor Kit“ nach den Angaben des Herstellers transfiziert. Dabei wurde das Programm U14 des Nukleofektors ausgewählt.

2.2.8. Infektion primärer T-Zellen

Die zur Infektion verwendeten Virusstocks wurden von S. Raupp generiert. Dabei wurden C8166 T-Zellen mit dem Volllängenplasmid des SIVagm3 unter Verwendung der DMRIE-C-Methode transfiziert. Sobald die Induktion von Synzytien zu beobachten war, wurden die

virushaltigen Überstände bei -80°C in Aliquots eingefroren und die Virustiter ($\text{TCID}_{50}/\text{ml}$, engl.: „tissue culture infectious dosis“) wurden bestimmt.

Zur Infektion humaner PBMC wurden die Zellen nach Isolation und CD8-Depletion mit PHA/IL-2 oder mit $\alpha\text{-CD3}/\alpha\text{-CD28}$ stimuliert (siehe Kapitel 2.2.4.) oder blieben unstimuliert. Nach zwei Tagen wurden je 1×10^7 Zellen (3,5 ml) mit einer moi von 1 infiziert und die $\alpha\text{-CD3}/\alpha\text{-CD28}$ -stimulierten Zellen wurden erneut mit $\alpha\text{-CD3}/\alpha\text{-CD28}$ stimuliert. Zwei Tage nach der Infektion wurden die Zellen dreimal gewaschen, es wurde Überstand abgenommen und bei -80°C eingefroren. Bis einschließlich Tag 11 nach der Infektion wurde alle 2-3 Tage je 2,5 ml Überstand abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Die Überstände wurden zwecks späterer Bestimmung der IL-2-Konzentration und RT-Aktivität bei -80°C eingefroren. Zu den PHA/IL-2-stimulierten Zellen wurde mit dem frischen Medium jeweils wieder PHA und IL-2 zugegeben.

2.2.9. Anreicherung von Viruspartikeln durch Ultrazentrifugation

Um Apobec3G in den Viruspartikeln nachzuweisen, wurden die Überstände NL-luc-transfizierter Zellen durch $45\text{ }\mu\text{m}$ -Filter filtriert und bei -80°C eingefroren.

Zur Pelletierung von Viruspartikeln wurden die Zellkulturüberstände bei 20°C im Wasserbad aufgetaut. 2 ml 20 % Succrose in TNE-Puffer wurden in Zentrifugenröhrchen (Beckmann, Palo Alto, USA) gegeben und vorsichtig mit dem Virusüberstand (meist 2,5 ml) überschichtet. Anschließend wurden die Röhrchen mit 6 ml DMEM-Vollmedium aufgefüllt. Die Ultrazentrifugation erfolgte bei 35 000 rpm und 4°C für 90 min. (L-80 Ultracentrifuge, Rotor SW 41, Beckmann, Palo Alto, USA). Der Überstand wurde abgenommen und die Pellets für 10 min. in den auf den Kopf gestellten Röhrchen getrocknet. Die pelletierten Viruspartikel wurden dann in $50\text{ }\mu\text{l}$ TLB (siehe Kapitel 2.3.4.) resuspendiert und bei -80°C eingefroren.

TNE-Puffer:

Tris pH 7,5	10 mM	(PEI)
NaCl	100 mM	(Merck, Darmstadt)
EDTA	1 mM	(PEI)

2.3. Methoden der Proteinbiochemie

2.3.1. Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration einer Lösung wurde der Bradford-Assay angewandt. Die Methode basiert auf einer Komplexbildung kationischer und nichtpolarer, hydrophober Seitenketten der Proteine mit Coomassie-Brillantblau, wodurch das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm zu 595 nm verschoben wird. Die Absorption bei 595 nm wird spektroskopisch gemessen und korreliert direkt mit der Proteinkonzentration.

Standardansatz:

200 µl	Protein Assay Reagenz (Bio-Rad, München)
800 µl	H ₂ O bidest.
5 µl	Proteinlösung

Die Ansätze wurden für 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert, dann wurde die Absorption bei 595 nm im Photometer (Gene Quant RNA/DNA Calculator, Amersham, Buckinghamshire, UK) gemessen. Anhand einer Eichkurve, die mit bekannten Mengen eines Standardproteins erstellt worden war, wurde die Proteinkonzentration der Probe bestimmt.

2.3.2. Reverse Transkriptase-Test (RT-Test)

Zur Quantifizierung von Viren im Überstand wurde der Lenti-RT Activity Assay von Cavid Tech (Uppsala, Schweden) verwendet, der die Aktivität der Reversen Transkriptase (RT) bestimmt. In diesem Test synthetisiert die RT anhand eines RNA-Templates einen DNA-Strang, in den auch markierte Nukleotide (BrdUTP, Bromo-deoxyuridine triphosphate) eingebaut werden. In einem zweiten Schritt bindet dann ein Antikörper an die BrdUMPs, der an die alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt ist. Das Enzym katalysiert die Bildung eines Farbstoffs, der im ELISA-Reader (Fluoroskan Ascent FL, Labsystems, Helsinki, Finnland) bei 405 nm detektiert werden kann. Durch Mitführen einer Standardreihe (HIV-1-rRT-standard) kann die Viruskonzentration der Probe bestimmt werden.

Für den RT-Test wurden je 10 µl der unverdünnten Proben eingesetzt. Der Assay wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt, allerdings wurde nur eine PolyA-Platte verwendet, die nach Beginn der RT-Reaktion 3 h inkubiert wurde. Die Messung im ELISA-Reader erfolgte 30 min. nach Zugabe des AP-Substrats.

2.3.3. Interleukin-2-ELISA

Zur Bestimmung der IL-2-Konzentration im Überstand infizierter Zellen, wurde der Quantikine human IL-2-ELISA (R&D Systems, Minneapolis, USA) verwendet. Dieser ELISA beruht auf einer Sandwich-Enzymimmunoassay-Technik. Im ersten Schritt bindet das IL-2 in der Probe an die immobilisierten IL-2-spezifischen monoklonalen Antikörper in der Mikrotiterplatte. Nach einem Waschschrift wird ein enzymgebundener polyklonaler Antikörper gegen IL-2 zugegeben. Es folgt ein erneuter Waschschrift bevor das Substrat zugegeben wird. Die Umsetzung des Substrats ist mit einer Farbreaktion verbunden, die im ELISA-Reader (Fluoroskan Ascent FL, Labsystems, Helsinki, Finnland) gemessen werden kann. Der ELISA wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.3.4. Zelllyse

Um Zellen zu lysieren wurden diese zunächst abzentrifugiert (1100 rpm, 5 min., Varifuge K, Heraeus, Osterode) und einmal in PBS (PEI) gewaschen. Anschließend wurden die Zellpellets in dem entsprechenden Lysispuffer aufgenommen (ca. 3×10^4 Zellen/ μ l), gut resuspendiert und für 30 min. auf Eis inkubiert. Die Lysate wurden abzentrifugiert (13 000 rpm, 5 min., 4°C, Biofuge Fresco, Heraeus, Osterode) und die Überstände entweder bei -20°C eingefroren oder direkt für Immunpräzipitation, Western Blot, Kinase-Assay, Coomassie-Färbung oder Luciferase-Assay eingesetzt. Für den Nachweis der Luciferaseaktivität im Luciferase-Assay wurde der Passive Lysis Buffer (Promega, Mannheim) verwendet, für andere Experimente entweder TLB oder RIPA.

TLB:

Tris pH 7,4	20 mM	(PEI)
NaCl	137 mM	(Merck, Darmstadt)
Glycerin	1 % (v/v)	(Fluka, Steinheim)
EDTA pH 8	2 mM	(PEI)
Tritin-X-100	1 % (v/v)	(Sigma, Taufkirchen)
Na- β -Glycerophosphat	50 mM	(Sigma, Taufkirchen)

frisch zugeben:

complete (Protease-Inhibitor-Cocktail)	1 Tablette/50 ml	(Roche, Mannheim)
Na-Orthovanadat	1 mM	(Calbiochem, Cambridge)
Benzamidin	5 mM	(Sigma, Taufkirchen)
Leupeptin	5 μ g/ml	(Sigma, Taufkirchen)
Aprotinin	5 μ g/ml	(Sigma, Taufkirchen)

RIPA:

Tris pH 8,0	25 mM	(PEI)
NaCl	137 mM	(Merck, Darmstadt)
Glycerin	1 % (v/v)	(Fluka, Steinheim)
Na-Deoxycholat	0,5 % (w/v)	(Sigma, Taufkirchen)
NP-40	1 % (v/v)	(USB, Cleveland, USA)
EDTA pH 8,0	2 mM	(PEI)
SDS	0,1 % (w/v)	(Merck, Darmstadt)

frisch zugeben:

complete (Protease-Inhibitor-Cocktail)	1 Tablette/50 ml	(Roche, Mannheim)
Na-Orthovanadat	1 mM	(Calbiochem, Cambridge)
Benzamidin	5 mM	(Sigma, Taufkirchen)
Leupeptin	5 µg/ml	(Sigma, Taufkirchen)
Aprotinin	5 µg/ml	(Sigma, Taufkirchen)

2.3.5. Immunpräzipitation

Um Proteine zu immunpräzipitieren, wurden zwischen 300 µg und 1500 µg Zelllysats eingesetzt. Alle Arbeiten wurden auf Eis ausgeführt, Beads wurden immer mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze pipettiert. Die Beads wurden dreimal mit PBS oder dem entsprechenden Lysispuffer (siehe Kapitel 2.3.4.) gewaschen und anschließend in einem Volumenverhältnis von 1:1 in Lysispuffer angesetzt. Die unten angegebene Menge Beads und Antikörper wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß zusammengegeben. Nach Zugabe des Zelllysats wurde zusätzlicher Lysispuffer bis zu einem Endvolumen von 1 ml zugegeben. Die Immunpräzipitation erfolgte für 1-2 h bei 4°C, wobei die Proben langsam „über-Kopf“ rotierten.

Anschließend wurden die Beads abzentrifugiert (12000 rpm, 30 sec., Centrifuge 5415, Eppendorf, Hamburg) und 3-5 mal in 1 ml Lysispuffer gewaschen. Für eine Western Blot-Analyse wurden die Beads mit 30 µl Lysispuffer und 15 µl 3xSDS-Probenpuffer aufgekocht (siehe Kapitel 2.3.6.). Im Falle der CDK-Depletionen wurden in den ersten beiden Depletionsrunden je 4 µg Antikörper eingesetzt, in den folgenden Depletionsrunden 2 µg Antikörper.

Für Immunpräzipitation verwendete Antikörper und Beads:

Antikörper	Menge	Quelle	Beads	Menge	Quelle
α -ERK1/2	1,2 μ g (6 μ l)	Santa Cruz	Prot A-Beads	30 μ l von 1:1	Roche
α -ERK2	2 μ g (2,4 μ l)	Upstate	Prot A-Beads	30 μ l von 1:1	Roche
α -JNK1	0,8 μ g (4 μ l)	Santa Cruz	Prot A-Beads	30 μ l von 1:1	Roche
α -p38	4 μ g (20 μ l)	Santa Cruz	Prot A-Beads	30 μ l von 1:1	Roche
α -CDK2	2 μ g (10 μ l)	Santa Cruz	Prot A-Beads Prot G-Beads	15 μ l von 1:1 15 μ l von 1:1	Roche, Amersham
α -CDK7	2 μ g (10 μ l)	Santa Cruz	Prot A-Beads Prot G-Beads	15 μ l von 1:1 15 μ l von 1:1	Roche, Amersham
α -CDK9	2 μ g (10 μ l)	Santa Cruz	Prot A-Beads Prot G-Beads	15 μ l von 1:1 15 μ l von 1:1	Roche, Amersham
α -HA Affinity Matrix	30-50 μ l	Roche	-	-	-

2.3.6. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE wandern Proteine in einem elektrischen Feld durch ein SDS-Polyacrylamid-Gel, wobei sie entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden. Das anionische Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) bindet dabei mit seiner stark negativen Ladung an die Proteine, wodurch die Laufgeschwindigkeit bei nicht-glykosylierten Proteinen von ihrer Eigenladung unabhängig wird. Die Zugabe von β -Mercaptoethanol in den Probenpuffer denaturiert die Proteine und reduziert die Disulfidbrücken. Zunächst sammeln sich die Proteine im Sammelgel, das einen niedrigen Acrylamid-Gehalt hat, im Trenngel erfolgt dann die Auftrennung in Proteinbanden.

Je nach Größe der aufzutrennenden Proteine wurden Trenngele mit einem Acrylamidgehalt von 9-14 % eingesetzt. Es wurde das Mini-Protean 3 Electrophoresis System (Bio-Rad, München) benutzt, wobei Glasplatten mit einem 1,5 mm Spacer gewählt wurden. Zunächst wurde das Trenngel gegossen und mit 96 % Ethanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren (30-60 min.) wurde das Ethanol abgeschüttet. Nach 10 min., in denen die Reste des Ethanols verdampften, wurde das Sammelgel gegossen und ein 10er-Kamm eingesteckt.

Die Proben wurden mit 3xSDS-Probenpuffer versetzt und bei 95°C 5-10 min. im Heizblock (Thermomixer 5436, Eppendorf) erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden die Proben in die Geltaschen gegeben, als Proteinmarker diente der SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen, Carlsbad, USA). Die Elektrophorese lief zunächst bei 120 V, dann bei 160-200 V in SDS-Laufpuffer, bis die sichtbare Farbstofffront das Gelende fast erreicht hatte (ca. 1,5 h).

Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gele (für zwei Gele):

Trenngel:

30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid	9-14 % (v/v)	(Roth, Karlsruhe)
1 M Tris pH 8,8	11,2 ml	(PEI)
10 % SDS	0,3 ml	(Merck, Darmstadt)
20 % APS	0,1 ml	(Sigma, Taufkirchen)
TEMED	0,02 ml	(Roth, Karlsruhe)
H ₂ O bidest.	ad 30,3 ml	

Sammelgel:

30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid	1,67 ml	(Roth, Karlsruhe)
1 M Trisbase pH 6,8	1,25 ml	(PEI)
10 % SDS	0,1 ml	(Merck, Darmstadt)
20 % APS	50 µl	(Sigma, Taufkirchen)
TEMED	10 µl	(Roth, Karlsruhe)
H ₂ O bidest.	7,03 ml	

3x-SDS-Probenpuffer:

Glycerin	30 % (v/v)	(Fluka, Steinheim)
SDS	6 % (w/v)	(Merck, Darmstadt)
Tris pH 6,8	125 mM	(PEI)
β-Mercaptoethanol	5 % (v/v)	(Sigma, Taufkirchen)
Bromphenolblau	0,06 % (w/v)	(Sigma, Taufkirchen)

SDS-Laufpuffer (PEI):

Tris	3 % (w/v)
Glycin	14,4 % (w/v)
SDS	1 % (w/v)

2.3.7. Western Blot-Analyse

Zum spezifischen Nachweis von Proteinen mittels Western Blot werden die Proteine zunächst im SDS-Gel aufgetrennt. Anschließend werden die Proteine auf eine Membran übertragen und dadurch immobilisiert. Dieser sogenannte Blotting-Vorgang kann durch Kapillarttransfer oder Elektrottransfer erfolgen. Hier wurde die Methode des ElektrobloTTings

angewandt. Nach der Immobilisierung wird ein spezifischer Antikörper zugegeben, der an das entsprechende Protein bindet. Über einen Sekundärantikörper, der an eine Peroxidase gekoppelt ist, kann ein Chemilumineszenzsubstrat zur Lichtemission angeregt und auf einem Röntgenfilm detektiert werden.

Zum Transfer der Proteine aus dem SDS-Gel auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond-C Extra, Amersham, Buckinghamshire, UK) wurde die Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, München) eingesetzt. Dabei wurden unter Vermeidung von Luftblasen Gel und Membran zwischen zwei Filterpapieren (Whatman, Maidstone, UK) in die entsprechende Vorrichtung eingesetzt. Die Kammer wurde mit Blotting-Puffer befüllt und der Elektrotransfer erfolgte bei 4°C und 330 mA für 1 h.

Nach dem Blotting erfolgte der Nachweis des entsprechenden Proteins. Zum Blocken der unspezifischen Bindungsstellen wurde die Membran über Nacht bei 4°C in 25 ml Blocking-Puffer inkubiert. Dann wurde die Membran mit dem in Blocking-Puffer verdünnten Primärantikörper inkubiert (3 h, RT, Kippschüttler). Nach dreimaligem Waschen (je 10 min. in 30 ml TBST) folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (in 2/3 TBST, 1/3 Blocking-Puffer, 45 min., RT, Kippschüttler). Anschließend wurde erneut dreimal mit TBST gewaschen. Zur Detektion wurde das ECL Western Blotting Detection System oder das ECL+plus Western Blotting Detection System (Amersham, Buckinghamshire, UK) verwendet.

Blotting-Puffer:

Glycin	192 mM	(Merck, Darmstadt)
Tris	25 mM	(Merck, Darmstadt)
SDS	0,015 % (w/v)	(Merck, Darmstadt)
Methanol	20 % (v/v)	(PEI)

TBST:

Tris pH 8,0	1 mM	(PEI)
NaCl	15 mM	(Merck, Darmstadt)
Tween20	0,05 % (v/v)	(Roth, Karlsruhe)

Blocking-Puffer:

Magermilchpulver in TBST	5 % (w/v)	(AppliChem, Darmstadt)
-----------------------------	-----------	------------------------

Für Western Blot verwendete Antikörper:

Primär-Antikörper	Verdünnung	Quelle	Sekundär-Antikörper	Verdünnung	Quelle
α -HA	1:5000 (stock 0,4 mg/ml)	Roche	α -mouse-HRP	1:7500	Amersham
α -CDK2	1:750	Santa-Cruz	Protein A-HRP	1:3000	Amersham
α -CDK7	1:750	Santa-Cruz	Protein A-HRP	1:3000	Amersham
α -CDK9	1:750	Santa-Cruz	Protein A-HRP	1:3000	Amersham
SIVagm3-antiserum	1:200	PEI (Antiserum von SIVagm3-inf. Nem170)	a-human IgG-HRP	1:1000	Sigma
α -Tubulin	1:7500	Abcam	a-Rat-HRP	1:5000	Amersham
HIV-1 _{HXB2} Vif Antiserum	1:1500	NIH AIDS Reagent Program	a-rabbit-HRP	1:7500	Amersham
α -p24	1:50	EF, PEI	a-mouse-HRP	1:7500	Amersham

2.3.8. Luciferase-Assay

Die Aktivität der Firefly-Luciferase wird über den Umsatz des Substrats Luciferin bestimmt. In Anwesenheit von ATP, Mg^{2+} und O_2 katalysiert die Luciferase die Oxidation des Luciferins über das Intermediat Luciferyl-AMP zu Oxyluciferin. Bei dieser Reaktion wird Fluoreszenzlicht emittiert und kann im Luminometer quantifiziert werden.

Die Untersuchung der Luciferaseaktivität erfolgte meistens 48 h nach Transfektion. Im Falle der Nukleofektion wurde der Luciferase-Assay bereits 6 h nach Nukleofektion durchgeführt. Es wurde das Luciferase Assay System (Promega, Mannheim) verwendet. Je 20 μ l Zelllysate wurden in eine weiße Mikrotiterplatten pipettiert und auf Raumtemperatur gebracht. Die Zugabe von je 50 μ l Substrat (Luciferase Assay Reagent, Promega, Mannheim) erfolgte automatisch im Luminometer (Microplate Luminometer LB 96 V, EG&G Berthold). Es wurde eine Einstellung gewählt, die 2 sec. nach Substratzugabe für 10 sec. die Lumineszenz misst. Die gemessene relative Luciferase-Aktivität wurde auf die Proteinkonzentration der Zelllysate standardisiert. In der Regel wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt, aus denen Mittelwert und Standardabweichung bestimmt wurden. Die Standardabweichung wurde mithilfe der Excel-Funktion STABW berechnet, die folgende Formel zugrunde legt:

$$\sigma = \sqrt{\frac{n \sum x^2 - (\sum x)^2}{n(n-1)}}$$

σ : Standardabweichung

n : Anzahl Messwerte

x : gemessene Luciferasewerte

2.3.9. Coomassie-Färbung von Proteinen

Mithilfe des Farbstoffs Coomassie-Brillantblau können Proteine direkt im SDS-Gel angefärbt werden. Dazu wurde das SDS-Gel kurz mit H₂O bidest. abgespült und für 3 h in der Coomassie-Färbelösung langsam geschüttelt. Anschließend wurde das Gel für mindestens 2 h in der Entfärbelösung inkubiert.

Coomassie-Färbelösung 1 Liter:

Coomassie Brilliant Blau G250	0,125 g	(Merck, Darmstadt)
Methanol	410 ml	(Merck, Darmstadt)
Essigsäure 98 %	70 ml	(Merck, Darmstadt)
H ₂ O bidest.	520 ml	(PEI)

Entfärbelösung 1 Liter:

Methanol	410 ml	(Merck, Darmstadt)
Essigsäure 98 %	70 ml	(Merck, Darmstadt)
H ₂ O bidest.	520 ml	(PEI)

2.3.10. Expression und Reinigung bakteriell exprimierter Fusionsproteine

Um bakteriell exprimiertes SIVagm3-Tat zu gewinnen, wurden 200 ml LB-Amp-Medium mit pGEX-6P-2-Tat_{SIVagm3} angeimpft und über Nacht kultiviert. Dann wurden 800 ml LB-Amp-Medium zugegeben. Das Wachstum der Bakterien wurde durch regelmäßiges Messen der optischen Dichte bei 600 nm verfolgt. Bei einer OD₆₀₀ > 0,6 erfolgte die Induktion mit 0,5 mM IPTG (Roth, Karlsruhe). 4,5 h nach Induktion wurden die Bakterien abzentrifugiert (10 min., 4000 rpm, Varifuge RF, Heraeus Sepatech, Osterode) und in 10 ml kaltem PBS resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde in ein 50 ml-Röhrchen überführt und mit kaltem PBS auf ein Volumen von 18 ml gebracht. Dann folgte die Ultraschall-Lyse der Bakterien (4x3 sec., dazwischen auf Eis stellen, Sonifier II Ultraschall Desintegrator 250, Branson Ultrasonic S.A., Carouge-Geneve, CH). Nach Zugabe von 2 ml 10 % Triton-X-100 (Sigma, Taufkirchen) wurden die Lysate für 15 min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Lysate durch Zentrifugation gereinigt (12 000 rpm, 10 min., 4°C, Corexröhrchen, Sorvall RC 5C Plus, Kendro, Langenselbold).

Die Aufreinigung des GST-Fusionsproteins und die Abspaltung des GST-Tags erfolgte mithilfe der GSTrap FF 1ml-Säulchen (Amersham, Buckinghamshire, UK) und der PreScission Protease (Amersham, Buckinghamshire, UK) bei 4°C im Kühlraum. Es wurde

nach den Angaben des Herstellers vorgegangen (GST Gene Fusion System Handbook, Amersham Biosciences). Unter Zuhilfenahme von 5 ml-Spritzen wurde die Säule mit 5 ml PBS äquilibriert, dann wurde das Bakterienlysate aufgetragen (Durchflussrate 0,2-1 ml/min.). Die Säule wurde mit 5-10 ml PBS gewaschen (1-2 ml/min.), dann wurde die PreScission Protease auf die Säule gebracht (160 units/920 µl PreScission cleavage buffer). Die Spaltung erfolgte für ca. 16 h. Dann wurde das abgespaltene Protein mit 3 ml PreScission cleavage buffer (1-2 ml/min.) eluiert, wobei GST und die Protease an die Säule gebunden bleiben. Das Eluat wurde in 500 µl-Fractionen aufgefangen. Durch Messung der Proteinkonzentration wurde die Fraktion mit dem abgespaltenen SIVagm3-Tat identifiziert.

PreScission cleavage buffer pH 7,0:

Tris-HCl	50 mM	(PEI)
NaCl	150 mM	(Merck, Darmstadt)
EDTA	1 mM	(PEI)
Dithiothreitol (DTT)	1 mM	(Sigma, Taufkirchen)

2.3.11. *In-vitro*-Kinase-Assay

MAP-Kinase-Assay

Zum Nachweis der spezifischen Phosphorylierung eines Proteins durch MAP-Kinasen, wurden die aktiven Kinasen aus stimulierten A3.01-Zellen immunpräzipitiert. Die Zellen wurden über Nacht in serumreduziertem Medium (0,3 % FKS) kultiviert, anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (1100 rpm., 5 min., RT, Varifuge K, Heraeus, Osterode) und in auf 37°C vorgewärmtes Vollmedium gegeben. Zur Aktivierung von ERK wurden die Zellen für 10-30 min. mit 100 ng/ml TPA (Sigma, Taufkirchen) stimuliert. Zur Aktivierung von JNK/SAPK erfolgte eine Stimulation für 30 min. mit 100 ng/ml TPA und 0,5 µM Ionomycin (Sigma, Taufkirchen). p38 wurde durch 30-minütige Stimulation mit 100 ng/ml TPA, 0,5 µM Ionomycin und 10 µg/ml Anisomycin (Sigma, Taufkirchen) stimuliert. Alle Stimulationen wurden in 50 ml-Röhrchen bei 37°C im Brutschrank durchgeführt. Als Kontrolle wurden auch unstimulierte Zellen verwendet. Die Stimulation wurde durch Zugabe von kaltem PBS abgestoppt, dann wurden die Zellen abzentrifugiert und mit kaltem PBS gewaschen. Je Ansatz wurden $2,5 \times 10^6$ A3.01-Zellen in Eppendorf-Reaktionsgefäßen abzentrifugiert (3500 rpm, 5 min., 4°C, Biofuge Fresco, Heraeus, Osterode) und in 400 µl RIPA-Lysispuffer lysiert (siehe Kapitel 2.3.4.). Die Immunpräzipitation der Kinasen erfolgte für zwei Stunden bei 4°C, wie unter 2.3.5. beschrieben. Dann wurden die Beads zweimal in RIPA-Lysispuffer und zweimal in MAP-Kinase-Puffer gewaschen.

HA-markierte Proteine, die als Substrate eingesetzt werden sollten, wurden in 293T-Zellen exprimiert, in RIPA-Lysispuffer lysiert (siehe Kapitel 2.3.4.) und durch Immunpräzipitation isoliert (siehe Kapitel 2.3.5.). Dabei wurden je Ansatz 5×10^5 - 1×10^6 Zellen verwendet. Identische Substrate wurden nach Möglichkeit in einem einzigen IP-Ansatz in 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen immunpräzipitiert. Anschließend wurden die Beads zweimal in RIPA-Lysispuffer und zweimal in MAP-Kinase-Puffer gewaschen.

Mit den Substraten wurden Mastermix-Ansätze hergestellt: Die rekombinanten Substrate ELK-1 (NEB, Schwalbach) oder ATF-2 (NEB, Schwalbach) oder die α -HA-Beads der IP wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen vorgelegt. Die restliche Flüssigkeit auf den Beads wurde mithilfe einer 27G-Kanüle (0,4x21mm) abgesaugt. Die Mastermix-Ansätze wurden hergestellt, indem für jede Kinase-Reaktion 15 μ l MAP-Kinase-Puffer und 0,75 μ l [γ - 33 P]-ATP (Amersham, Buckinghamshire, UK, bei den ersten Experimenten auch [γ - 32 P]-ATP) zu den Substraten gegeben wurde.

Nach Absaugen der restlichen Flüssigkeit auf den Kinase-gekoppelten Beads mithilfe einer G27-Kanüle, wurden je 15 μ l aus den entsprechenden Substrat-Mastermix-Ansätzen zu den Kinasen gegeben. Substrate, die an Beads gekoppelt waren, wurden nach kurzem Vortexen mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze pipettiert. Die Kinase-Reaktion erfolgte bei 30°C für 30 min. im Heizblock (Thermomixer 5436, Eppendorf). Dann wurden die Proben mit je 15 μ l 3xSDS-Probenpuffer bei 95°C für 10 min. im Heizblock aufgekocht. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE (siehe Kapitel 2.3.6.) aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet (siehe Kapitel 2.3.7.). Die Membran wurde 10 min. in 5 % BSA-Lösung inkubiert und anschließend 10 min. in TBST gewaschen. Die Membran wurde kurz zwischen zwei Zellstofftüchern getrocknet und in eine Filmkassette eingelegt. Der Nachweis der 33 P-phosphorylierten Proteine erfolgte mithilfe der Kodak BioMax MR-Filme und der Kodak BioMax Transcreen LE Intensifying Screen. Für 32 P-markierte Proteine wurden Hyperfilm MP-Filme (Amersham, Buckinghamshire, UK) verwendet.

MAP-Kinase-Puffer:

Tris-HCl pH 7,5	25 mM	(PEI)
MgCl ₂	10 mM	(PEI)
β -Glycerophosphat	5 mM	(Sigma, Taufkirchen)

frisch zugeben:

Dithiothreitol (DTT)	2 mM	(Sigma, Taufkirchen)
Na-Orthovanadat	1 mM	(Calbiochem, Cambridge)

5 % BSA-Lösung:

BSA	5 % (w/v)	(Roth, Karlsruhe)
Natriumazid	0,1 % (w/v)	(Merck, Darmstadt)

CDK9-Kinase-Assay

Aktive CDK9 wurde aus 293T-Zellen immunpräzipitiert (siehe Kapitel 2.3.5.). Je Ansatz wurden $2\text{-}5 \times 10^6$ Zellen eingesetzt. Der Kinase Assay wurde unter Verwendung eines CDK9-Kinase-Puffers analog dem MAPK-Assay durchgeführt. Die Inkubationszeit während der Kinase-Reaktion bei 30°C betrug 40 min..

CDK9-Kinase-Puffer:

Tris-HCl pH 7,5	50 mM	(PEI)
MgCl ₂	10 mM	(PEI)
MnCl ₂	2,5 mM	(Merck, Darmstadt)

frisch zugeben:

Dithiothreitol (DTT)	2 mM	(Sigma, Taufkirchen)
Na-Orthovanadat	1 mM	(Calbiochem, Cambridge)

PKC-Kinase-Assay

Der PKC-Kinase-Assay wurde mit rekombinantem Enzym (Mischung aus PKC- α , PKC- β und PKC- γ , Upstate, Lake Placid, USA) durchgeführt.

HA-markierte Proteine, die als Substrate eingesetzt werden sollten, wurden in 293T-Zellen exprimiert, in RIPA-Lysispuffer lysiert (siehe Kapitel 2.3.4.) und durch Immunpräzipitation isoliert (siehe Kapitel 2.3.5.). Je Ansatz wurden die Zellen eines transfizierten 6-well eingesetzt und einzeln immunpräzipitiert. Nach der Immunpräzipitation wurden die Beads zweimal in RIPA-Lysispuffer und zweimal in PKC-Kinase-Puffer gewaschen. Die restliche Flüssigkeit auf den Beads wurde mithilfe einer G27-Kanüle abgesaugt. Als Positivkontrolle wurde das rekombinante Substrat MBP (Upstate, Lake Placid, USA) eingesetzt.

Das radioaktive ATP wurde als Mastermix angesetzt: für jeden Ansatz 1 μl [γ -³³P]-ATP und 9 μl PKC-Kinase-Puffer mit 75 mM MgCl₂. Der PKC Lipid Activator (Upstate, Lake Placid, USA) wurde in einem mit Eiswasser gefüllten Ultraschallbad für >1 min. beschallt, um die Lipide in Lösung zu bringen. Dann wurden 10 μl PKC Lipid Activator, 2 μl PKC und 10 μl aus dem ATP-Mix in jeden Substratansatz gegeben. Die Proben wurden für 20 min. bei 30°C im Heizblock (Thermomixer 5436, Eppendorf) unter Schütteln inkubiert. Nach Zugabe von je 17 μl 4xSDS-Puffer (Roti-Load1, Roth, Karlsruhe) wurden die Proben für 10 min. bei 95°C im

Heizblock aufgekocht. Es folgten SDS-PAGE, Blotting und Detektion der phosphorylierten Proteine wie für den MAP-Kinase-Assay beschrieben.

PKC-Kinase-Puffer pH 7,2:

MOPS	20 mM	(Serva, Heidelberg)
β -Glycerophosphat	25 mM	(Sigma, Taufkirchen)
CaCl_2	1 mM	(PEI)
<i>frisch zugeben:</i>		
Dithiothreitol (DTT)	1 mM	(Sigma, Taufkirchen)
Na-Orthovanadat	1 mM	(Calbiochem, Cambridge)

2.3.12. *In-vivo*-Markierung mit radioaktivem Orthophosphat

Die *in-vivo*-Markierung mit ^{33}P -Orthophosphat wurde durchgeführt, um den Phosphorylierungsstatus von HA-markierten Proteinen in der Zelle zu untersuchen. Dazu wurden 293T-Zellen in kleinen Zellkulturflaschen (12,5 cm², filterloser Verschluss, BD Biosciences, Heidelberg) mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert. Nach zwei Tagen wurde das Medium durch je 1 ml phosphatfreies DMEM (DMEM phosphat- und carbonatfrei, Sigma, Taufkirchen, 3,7 g/l Natriumcarbonat (Sigma) wurden zugesetzt, dialysiertes FKS (Gibco Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA)) mit 400 $\mu\text{Ci/ml}$ $^{33}\text{PO}_4^{2-}$ (Amersham, Buckinghamshire, UK) ersetzt. Die Zellen wurden für 3,5 h bei 37°C im Hybridisierungsofen bei fest verschlossenem Verschluss inkubiert. Bei einigen Ansätzen wurde für die letzten 60 min. der Inkubationszeit 100 ng/ml TPA (Sigma, Taufkirchen) zugegeben. Alle weiteren Schritte wurden bei 4°C ausgeführt. Die Zellen wurden zweimal in kaltem PBS gewaschen, dann wurden je 1 ml RIPA auf die Zellen gegeben. Nach 10 min. Inkubation auf Eis, wurden die bereits abgelösten Zellen in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und weitere 20 min. auf Eis inkubiert. Die Proben wurden abzentrifugiert (Centrifuge 5415, Eppendorf, Hamburg) und das Lysat für eine α -HA-Immunpräzipitation eingesetzt (siehe Kapitel 2.3.5.). Nach der IP wurden die Beads 5-mal mit 1 ml RIPA-Lysispuffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden ca. 30 μl Puffer auf den Beads belassen und 15 μl 3xSDS-Probenpuffer zugegeben. Die Proben wurden bei 95°C für 10 min. aufgekocht, dann folgten SDS-PAGE, Blotting und Detektion der phosphorylierten Proteine wie für den Kinase-Assay beschrieben.

3. ERGEBNISSE

3.1. Induktion der Interleukin-2-Expression durch das simiane Immundefizienzvirus SIVagm3

Der für eine effektive Immunantwort essentielle T-Zell-Wachstumsfaktor Interleukin-2 (IL-2) spielt möglicherweise bei der Pathogenese der HIV/SIV-Infektion eine wichtige Rolle. Zwei Publikationen konnten zeigen, dass HIV-1-infizierte T-Zellen nach anti-CD3/anti-CD28-Stimulation (α -CD3/ α -CD28) verstärkt IL-2 ausschütten (Ott et al. 1997, Wu et al. 2001). Im ersten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, ob das simiane Immundefizienzvirus SIVagm3, welches in humanen Zellen replizieren kann, aber apathogen ist, ebenfalls die Expression von IL-2 induzieren kann und welche molekularen Mechanismen hierbei eine Rolle spielen.

3.1.1. Sekretion von Interleukin-2 nach Infektion humaner PBMC mit SIVagm3

Um den Einfluss des SIVagm3 auf die Sekretion von IL-2 zu untersuchen, wurden humane primäre T-Lymphozyten mit SIVagm3 infiziert. Aus dem Vollblut eines gesunden Spenders wurden die peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) durch Ficollgradientenzentrifugation aufgereinigt und die CD8-positiven Zellen durch magnetische Zellsortierung entfernt. Anschließend erfolgte eine suboptimale Stimulation mit 1 μ g/ml α -CD3 und 1 μ g/ml α -CD28, mit welcher der Schwellenwert der Zellaktivierung nicht erreicht werden sollte, oder

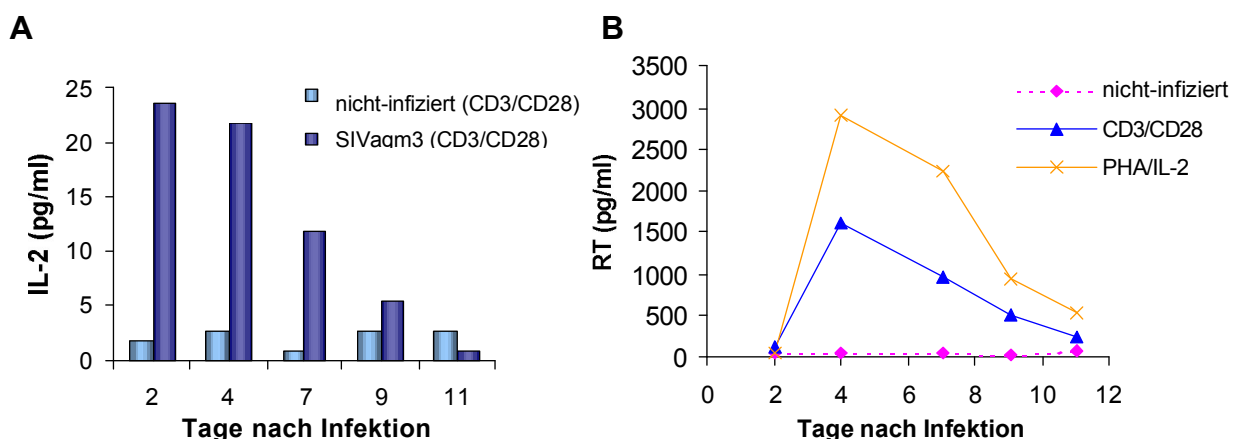


Abbildung 3.1 : Analyse der IL-2-Sekretion nach Infektion humaner CD8-depletierter PBMC mit SIVagm3. Unterschiedlich stimulierte CD8-depletierete humane PBMC wurden mit SIVagm3 infiziert (moi=1). (A): Die IL-2-Konzentration im Überstand suboptimal CD3/CD28-stimulierter Zellen wurde im ELISA analysiert. (B): Die Virusreplikation wurde durch Messung der reversen Transkriptase-Konzentration (RT) im Überstand überprüft.

als Kontrolle für eine optimale Virusreplikation die Stimulation mit 0,2 µg/ml PHA und 180 IE/ml IL-2. Nach zwei Tagen wurden die Zellen mit einer moi (engl.: „multiplicity of infection“) von 1, also einem infektiösen Viruspartikel pro Zelle infiziert und erneut mit 1 µg/ml α -CD3/ α -CD28 stimuliert. Die PHA/IL-2-stimulierten Zellen wurden während des gesamten Experiments in Medium mit PHA und IL-2 gehalten. In Abständen von 2-3 Tagen wurden von allen Ansätzen Überstände abgenommen um die IL-2-Konzentration im ELISA (engl.: „enzyme-linked immunosorbent assay“) zu bestimmen. Die Virusreplikation wurde durch Messung der Konzentration des viralen Enzyms Reverse Transkriptase (RT) im Überstand kontrolliert. Wie Abbildung 3.1 B zeigt, replizierte SIVagm3 in α -CD3/ α -CD28-stimulierten Zellen mit RT-Werten von bis zu 1600 pg/ml und in PHA/IL-2-stimulierten Zellen mit RT-Werten von bis zu 2900 pg/ml. Die Messung von IL-2 im Überstand α -CD3/ α -CD28-stimulierter Zellen zeigte eine Sekretion des Zytokins, die bereits an Tag 2 den Maximalwert von 24 pg/ml (Abb. 3.1 A) erreichte. Insgesamt folgte die Virusreplikation dem Verlauf der IL-2-Aktivierung, die zeitlich etwas früher einsetzte. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Infektion von T-Zellen mit SIVagm3 die Sekretion des T-Zell-Wachstumsfaktors Interleukin-2 induzieren kann.

3.1.2. Transkriptionelle Aktivierung des IL-2-Promotors durch SIVagm3 und HIV-1

Als nächstes wurde untersucht, ob die SIVagm3-induzierte IL-2-Sekretion auf eine verstärkte transkriptionelle Aktivierung des IL-2-Promotors zurückzuführen ist. Dazu wurde das Reporterplasmid IL-2-luc verwendet, in welchem die Expression des Luciferase-Reportergens durch den humanen IL-2-Promotor kontrolliert wird (Abb. 3.2).

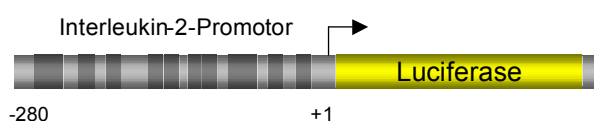


Abbildung 3.2 : Aufbau des Reporterplasids IL-2-luc. Die Expression des Reportergens wird durch den humanen IL-2-Promotor gesteuert.

Für diesen Versuch und die folgenden Promotorstudien wurde die humane T-Zelllinie A3.01 verwendet, da diese Zellen auf die Stimulation mit dem Phorbol ester TPA und dem Ca^{2+} -Ionophor Ionomycin physiologisch reagieren und Interleukin-2 ausschütten (nicht gezeigt). Das Reporterplasmid IL-2-luc und unterschiedliche DNA-Mengen des molekularen Vollängenplasids von SIVagm3 oder HIV-1(NL4-3) wurden in A3.01 Zellen kotransfiziert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen lysiert, um die Luciferaseaktivität zu bestimmen. Abbildung 3.3 zeigt, dass die Transfektion von SIVagm3 zu einer dosisabhängigen

transkriptionellen Aktivierung des IL-2-Promotors führte. Schon nach Transfektion von 0,01 µg des Volllängenplasmids des SIVagm3 war im Vergleich zur basalen Aktivität des IL-2-Promotors eine 7fach erhöhte Promotoraktivität festzustellen. Transfektion von 0,5 µg SIVagm3 verstärkte die transkriptionelle Aktivität des IL-2-Promotors um den Faktor 38. Dagegen wurde nach Transfektion von HIV-1(NL4-3) nur eine maximal 10-fache Verstärkung der Reporterexpression festgestellt. Zur Kontrolle wurden A3.01-Zellen mit TPA und Ionomycin stimuliert. Mit diesem klassischen T-Zell-Stimulus, der die MAPK-Signalkaskaden und weitere intrazelluläre Signalwege aktiviert, die zur T-Zell-Aktivierung und IL-2-Synthese führen, wurde die transkriptionelle Aktivität des IL-2-Promotors im Vergleich zur basalen Aktivität um den Faktor 12 erhöht. Beide Substanzen alleine hatten keinen Einfluss auf die Genexpression. Diese Ergebnisse zeigen, dass SIVagm3 eine transkriptionelle Aktivierung des IL-2-Promotors induziert, die deutlich stärker ist als die HIV-1(NL4-3)-induzierte Aktivierung.

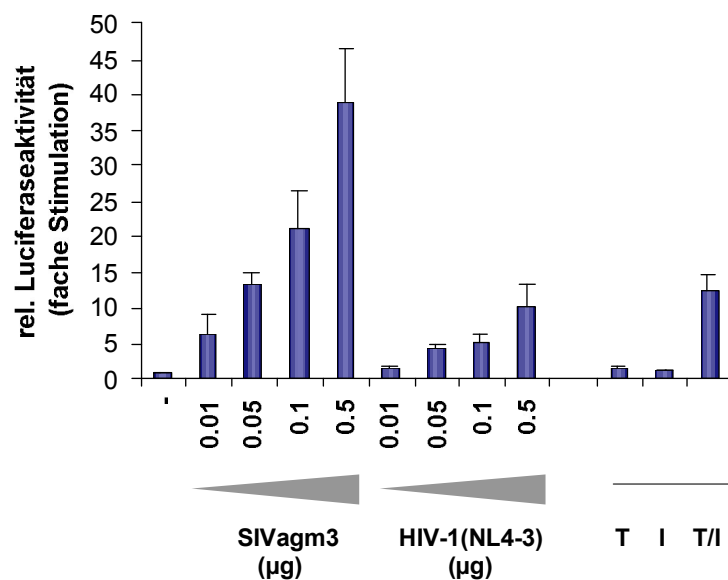


Abbildung 3.3 : Einfluss von SIVagm3 und HIV-1(NL4-3) auf die IL-2-Promotor-Aktivität. Zwei Tage nach Transfektion von A3.01-Zellen mit 0,5 µg IL-2-luc und den angegebenen Mengen der Volllängenplasmide von SIVagm3 oder HIV-1(NL4-3) wurden die Luciferaseaktivitäten bestimmt. Kontrollzellen wurden für 15 h mit 20 ng/ml TPA (T) und/oder 0,5 µM Ionomycin (I) stimuliert. Die Luciferaseaktivität des Reporterplasmids allein wurde auf 1 gesetzt.

3.1.3. Induktion der IL-2-mRNA-Synthese durch SIVagm3

Die erhöhte transkriptionelle Aktivität des IL-2-Promotors nach Transfektion von SIVagm3 sollte zu einem Konzentrationsanstieg der IL-2-mRNA führen. Um dies zu untersuchen, wurde die RNA SIVagm3-transfizierter A3.01-Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transfektion für eine RT-PCR (engl.: „polymerase chain reaction“) isoliert. Durch reverse Transkription wurde cDNA hergestellt, die anschließend für eine PCR mit IL-2-spezifischen Primern eingesetzt wurde. Als Positivkontrolle dienten Zellen, die für 7 h mit TPA und

Ionomycin stimuliert worden waren. Da mit dieser RT-PCR zunächst nur im Falle der TPA/Ionomycin-stimulierten Zellen IL-2-mRNA detektiert werden konnte (nicht gezeigt), wurde anschließend mit einem zusätzlichen inneren Primer-Paar eine nested RT-PCR durchgeführt. Abb 3.4 zeigt, dass eine IL-2-mRNA-Synthese ab 30 h nach Transfektion mit SIVagm3 nachgewiesen werden konnte.



Abbildung 3.4 : Nachweis von IL-2-mRNA nach Transfektion mit SIVagm3. A3.01-Zellen wurden mit 1 µg SIVagm3 transfiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Transfektion wurde die RNA isoliert und für eine nested RT-PCR eingesetzt. Als Positivkontrolle dienten mit 20 ng/ml TPA (T) und 0,5 µM Ionomycin (I) stimulierte Zellen.

3.1.4. Beteiligte intrazelluläre Signalkaskaden

Wie in Kapitel 1.3. beschrieben, werden bei der antigenen Stimulation einer T-Zelle verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert, welche zu T-Zellaktivierung und IL-2-Synthese führen. An diesem Prozess sind sowohl die MAP-Kinase-Signalwege, als auch die Ca^{2+} -abhängige Calcineurin/NF-AT-Signalkaskade beteiligt. Insbesondere letzterer Signalweg wird als essentiell für die IL-2-Induktion angesehen.

Zur Charakterisierung der intrazellulären Signalwege, die nach Transfektion von SIVagm3 zur IL-2-Induktion führen, wurden spezifische Inhibitoren gegen die drei MAPK-Signalwege bzw. der Calcineurin-Inhibitor Cyclosporin A eingesetzt. Zunächst wurde die Funktionalität dieser Inhibitoren an TPA/Ionomycin-stimulierten A3.01-Zellen überprüft. Nach Transfektion des IL-2-luc-Reporterplasmids hemmte die Behandlung mit 25 µM oder 40 µM des MEK-Inhibitors U0126, des p38-Inhibitors SB203580 oder des JNK-Inhibitors SP600125 die durch TPA/Ionomycin induzierte Luciferase-Expression fast vollständig (Abb. 3.5 A). Auch 30-300 ng/ml Cyclosporin A inhibierte die IL-2-Induktion durch TPA und Ionomycin (Abb. 3.5 C). Da die verwendeten Inhibitoren bei 37°C nur begrenzt stabil sind, wurden die Zellen bereits 30 h nach der Transfektion für den Luciferase-Assay lysiert. Um zu untersuchen, welche Signalwege SIVagm3 zur IL-2-Induktion benötigt, wurden A3.01-Zellen mit IL-2-luc und SIVagm3 kotransfiziert. Abbildung 3.5 B zeigt, dass durch Behandlung mit dem MEK-Inhibitor U0126, p38-Inhibitor SB203580 oder JNK-Inhibitor SP600125 die durch SIVagm3 induzierte IL-2-Promotor-Aktivität um 81 %, 73 % bzw. 65 % reduziert wurde. Dagegen hatte Cyclosporin A überraschenderweise keinen Effekt (Abb. 3.5 D). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die drei MAPK-Signalwege an der Regulation der SIVagm3-stimulierten IL-

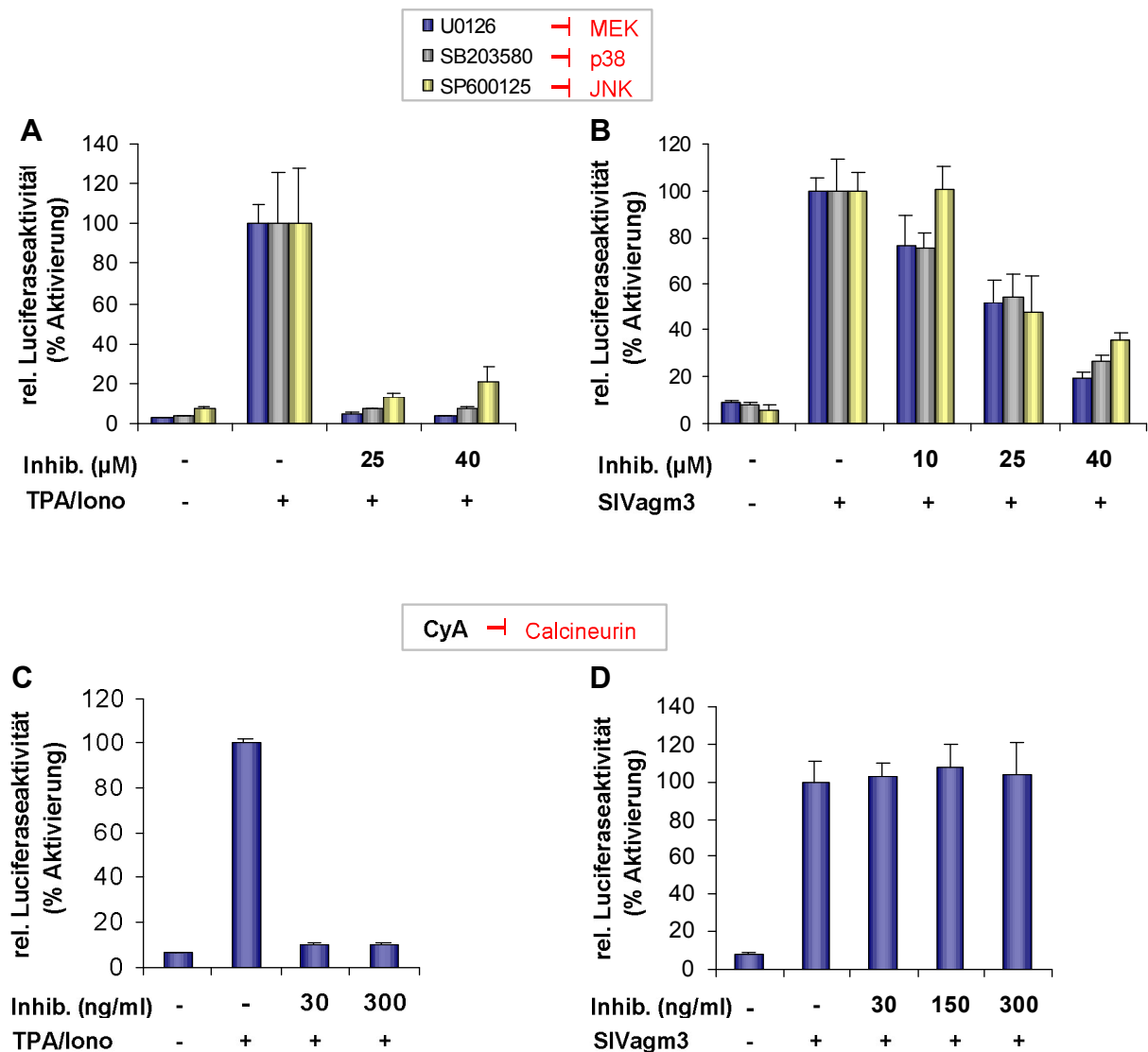


Abbildung 3.5 : Einfluss der Inhibition verschiedener intrazellulärer Signalwege auf die IL-2-Induktion durch SIVagm3. (A): A3.01-Zellen wurden mit 0,5 μg IL-2-luc transfiziert und anschließend mit den angegebenen Konzentrationen der MAPK-Inhibitoren behandelt. 7 h vor der Lyse wurden die Zellen mit 20 ng/ml TPA und 0,5 μM Ionomycin stimuliert (TPA/Iono). Kontrollzellen blieben unstimuliert. (B): Nach Kotransfektion von A3.01-Zellen mit 0,5 μg IL-2-luc und 0,5 μg SIVagm3 wurden die MAPK-Inhibitoren in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt. Kontrollzellen wurden nur mit IL-2-luc transfiziert. (C): A3.01-Zellen wurden mit 0,5 μg IL-2-luc transfiziert und anschließend mit den angegebenen Konzentrationen Cyclosporin A (CyA) behandelt. 7 h vor der Lyse wurden die Zellen mit 20 ng/ml TPA und 0,5 μM Ionomycin stimuliert (TPA/Iono). Kontrollzellen blieben unstimuliert. (D): Nach Kotransfektion von A3.01-Zellen mit 0,5 μg IL-2-luc und 0,5 μg SIVagm3 wurde Cyclosporin A (CyA) in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt. Kontrollzellen wurden nur mit IL-2-luc transfiziert.

Alle Ansätze wurden 30 h nach der Transfektion für den Luciferase-Assay lysiert. Die Luciferaseaktivitäten der TPA/Ionomycin- oder SIVagm3-stimulierten Zellen ohne Inhibitoren wurde auf 100 % gesetzt. Die Luciferasewerte wurden auf DMSO-Kontrollen, nicht auf Proteinmenge normalisiert, da die Inhibitoren zum Teil die Zellproliferation hemmen.

2-Genexpression beteiligt sind, wohingegen eine Calcineurin-Aktivität keine Rolle spielt. Damit verwendet SIVagm3 im Gegensatz zur den Mechanismen bei der klassischen T-Zellaktivierung einen Calcineurin-unabhängigen Signalweg, der zur IL-2-Induktion führt.

3.1.5. Aktivierung responsiver DNA-Elemente des IL-2-Promotors durch SIVagm3

Der IL-2-Promotor enthält viele hochkonservierte Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, sogenannte responsive DNA-Elemente (Serfling et al. 1995). In Abb. 3.6 sind die für die IL-2-Induktion wichtigsten Transkriptionsfaktoren dargestellt. Insbesondere NF-AT (engl.: „nuclear factor of activated T cells“) wird eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung der IL-2-Synthese zugeschrieben.

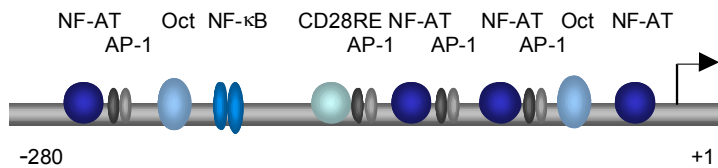


Abbildung 3.6 : Schematische Darstellung des IL-2-Promotors. Dargestellt sind die Transkriptionsfaktoren, die an den IL-2-Promotor binden.

Um zu untersuchen, welche dieser responsiven DNA-Elemente bei der IL-2-Induktion durch SIVagm3 eine Rolle spielen, wurden Reporterplasmide verwendet, bei denen mehrere Kopien des NF-AT-, NF-κB-, AP-1- oder CD28/AP-1-responsiven Elements sowie ein Minimalpromotor vor ein Luciferase-Reportergen geschaltet sind. Der Aufbau dieser Plasmide ist in Abbildung 3.7 dargestellt.

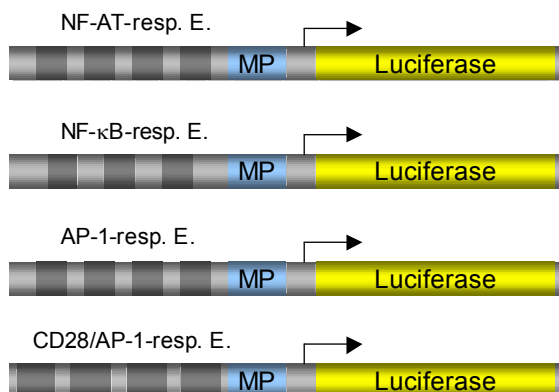


Abbildung 3.7 : Aufbau der Reporterplasmide NF-AT-luc, NF-κB-luc, AP-1-luc und CD28/AP-1-luc. Mehrere Kopien des jeweiligen responsiven DNA-Elements kontrollieren mit einem Minimalpromotor (MP) die Expression des Luciferase-Reportergens.

Zunächst wurde die Funktionalität der Reporterplasmide überprüft, indem A3.01-Zellen mit den Konstrukten transfiziert und anschließend für 15 h mit TPA und Ionomycin stimuliert wurden. Dieser Stimulus führte bei allen Plasmiden zu einer Aktivierung der Luciferase-Expression (Abb. 3.8 A, nur gezeigt für NF-AT-luc). Die Kotransfektion der Reporterplasmide mit SIVagm3 zeigte, dass die NF-AT-kontrollierte Genexpression durch SIVagm3 nicht beeinflusst wurde (Abb. 3.8 A). Dagegen erhöhte sich die transkriptionelle Aktivität des NF-κB-Bindungsmotivs um den Faktor 2,4. Die AP-1-abhängige Luciferaseexpression wurde

ebenfalls nicht signifikant verändert, während sich die transkriptionelle Aktivität des kombinierten Bindungsmotivs CD28/AP-1 um den Faktor 4,6 erhöhte. Diese Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen aus Kapitel 3.1.4., dass der Calcineurin/NF-AT-Signalweg bei der SIVagm3-vermittelten IL-2-Induktion nicht beteiligt ist. Dagegen wurde vor allem eine transkriptionelle Aktivierung des CD28/AP-1-responsiven Elements beobachtet.

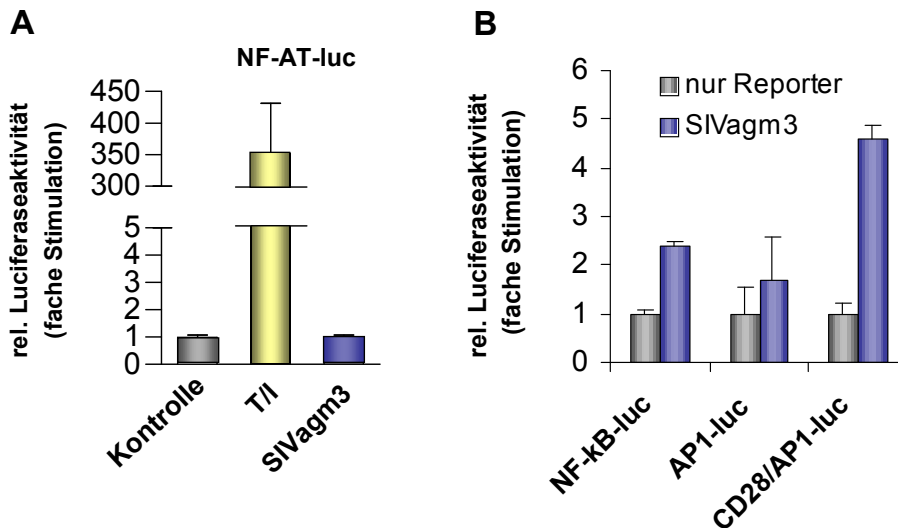


Abbildung 3.8 : Aktivierbarkeit verschiedener responsiver DNA-Elemente durch SIVagm3. (A): 0,5 µg NF-AT-luc wurde alleine oder mit 0,5 µg SIVagm3 in A3.01-Zellen transfiziert. Als Kontrolle dienten mit 20 ng/ml TPA und 0,5 µM Ionomycin stimulierte Zellen (T/I). (B): Transfektion von 0,5 µg der Reporterplasmide NF-κB-luc, AP-1-luc oder CD28/AP-1-luc alleine oder mit 0,5 µg SIVagm3 in A3.01-Zellen. 48h nach Transfektion wurden die Zellen für einen Luciferase-Assay lysiert. Die basale Aktivität der jeweiligen Reporterkonstrukte wurde auf 1 gesetzt.

3.1.6. Konstruktion eines Expressionsplasmids für SIVagm3-Tat

Frühere Veröffentlichungen zeigen, dass das CD28-responsive Element an der IL-2-Induktion durch das virale Protein Tat (engl.: „transactivator of transkription“) von HIV-1 beteiligt ist (Ott et al. 1997, Marsh et al. 2001). Daher wurde untersucht ob SIVagm3-Tat ebenfalls in der Lage ist, die transkriptionelle Aktivität des IL-2-Promotors über das CD28-responsive Element zu verändern.

Zunächst wurde ein SIVagm3-Tat-Expressionsplasmid konstruiert. Dazu wurden im ersten Schritt die beiden Tat-Exons aus dem das Volllängengenom des SIVagm3 tragenden Plasmid mittels PCR amplifiziert. An das 5'-Ende des ersten Tat-Exons wurde über den Plusprimer ein HA-Tag und eine *Xho* I-Restriktionsschnittstelle angefügt. Für die Amplifizierung des zweiten Tat-Exons wurde ein Plusprimer mit 15 Basen Überhang verwendet, die den letzten 15 Basen des ersten Exons entsprechen, über den Minusprimer

wurde eine *Spe* I-Schnittstelle eingefügt. Anschließend wurden beide Fragmente in einer Fusions-PCR vereinigt. Das resultierende Produkt wurde über die Restriktionsschnittstellen *Xho* I und *Spe* I in das Expressionsplasmid pBS-kRSPA inseriert (pBS-kRSPA-HA-Tat_{SIVagm3}) und in dem *E. coli*-Stamm DH5 α (Gibco Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA) vermehrt. Zusätzlich wurde die gleiche Konstruktion ohne HA-Tag durchgeführt (pBS-kRSPA-Tat_{SIVagm3}) und zum Vergleich wurden analoge HIV-1(NL4-3)-Tat-Expressionsplasmide konstruiert (pBS-kRSPA-Tat_{NL4-3} und pBS-kRSPA-HA-Tat_{NL4-3}). Im α -HA-Western Blot konnte gezeigt werden, dass die HA-markierten Tat-Proteine tatsächlich exprimiert wurden (nicht gezeigt).

Die wichtigste Aufgabe des Tat-Proteins ist die Transaktivierung des viralen LTR-Promotors (engl.: „long terminal repeat“). Um die Funktionalität des exprimierten SIVagm3-Tat zu überprüfen und festzustellen, ob der HA-Tag die Funktion des Proteins verändert, wurde daher ein Reporterplasmid verwendet, in welchem die Luciferase-Expression durch die HIV-1(NL4-3)-LTR reguliert wird (pGL3-enhancer-NL4-3-LTR-luc). Das Reporterplasmid wurde alleine bzw. mit einem SIVagm3-Tat-exprimierenden Plasmid in A3.01-Zellen transfiziert, worauf nach 2 Tagen ein Luciferase-Assay durchgeführt wurde. Sowohl das HA-markierte Tat als auch das nicht-markierte Tat waren in der Lage, die HIV-LTR-kontrollierte Genexpression um den Faktor 25-29 zu verstärken. Das exprimierte SIVagm3-Tat war also funktionell aktiv und wurde durch den HA-Tag funktionell nicht beeinträchtigt.

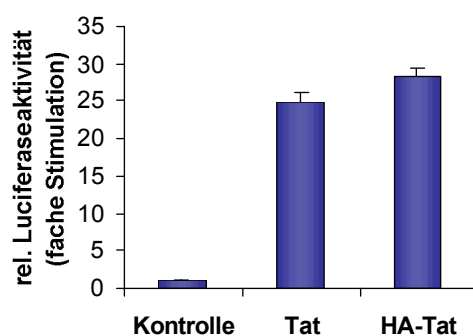


Abbildung 3.9 : LTR-Transaktivierung durch SIVagm3-Tat. A3.01-Zellen wurden mit 0,5 μ g pGL3-enhancer-NL4-3-LTR-luc und 1 μ g des HA-markierten oder nicht-markierten SIVagm3-Tat-Expressionsplasmids transfiziert. Nach 2 Tagen wurde ein Luciferase-Assay durchgeführt. Die basale Luciferaseaktivität des Reporterplasmids wurde auf 1 gesetzt (Kontrolle).

3.1.7. Aktivierung des CD28/AP-1-responsiven Elements und des IL-2-Promotors durch SIVagm3-Tat und HIV-1(NL4-3)-Tat

Mithilfe des SIVagm3-Tat-Expressionsplasmids sollte herausgefunden werden, ob Tat bei der IL-2-Aktivierung durch SIVagm3 eine Rolle spielt. Dazu wurden A3.01-Zellen mit pBS-kRSPA-Tat_{SIVagm3} und IL-2-luc bzw. CD28/AP-1-luc kotransfiziert, worauf nach 48 h die

Luciferaseaktivität gemessen wurde. Dabei blieben die Zellen unstimuliert oder wurden für 15 h mit TPA und Ionomycin aktiviert.

In unstimulierten Zellen hatte die Expression von SIVagm3-Tat keinen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität des CD28-responsiven Elements oder des IL-2-Promotors (Abb. 3.10). In aktivierten Zellen dagegen konnte im Vergleich zur Mock-Kontrolle eine ca. 7-fache Aktivierung der CD28/AP-1-kontrollierten Transkription, bzw. eine 4,3-fache Aktivierung des IL-2-Promotors beobachtet werden.

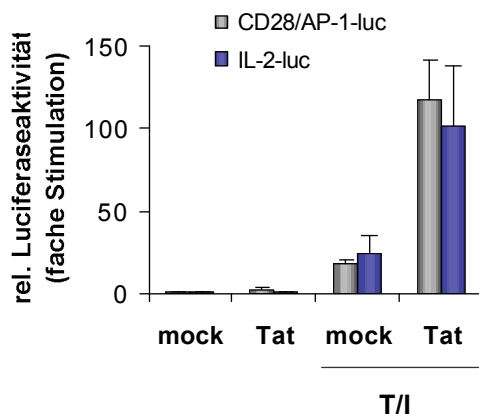


Abbildung 3.10 : Einfluss von SIVagm3-Tat auf die Aktivität des CD28-responsiven Elements und des IL-2-Promotors. A3.01-Zellen wurden mit 0,5 µg IL-2-luc bzw. CD28/AP-1-luc sowie 2 µg des Leerplasmids pBS-kRSPA (mock) oder des Tat-Expressionsplasmids pBS-kRSPA-Tat_{SIVagm3} (Tat) kotransfiziert. Ein Teil der Zellen wurde 15 h vor der Lyse für den Luciferase-Assay mit 20 ng/ml TPA und 0,5 µM Ionomycin stimuliert (T/I). Die relative Luciferaseaktivität der Mock-Kontrollen in unstimulierten Zellen wurde auf 1 gesetzt.

Wie in Kapitel 3.1.2. beschrieben, hatte SIVagm3 einen wesentlich stärkeren aktivierenden Einfluss auf den IL-2-Promotor als HIV-1(NL4-3). Um festzustellen, ob dieser Unterschied in den Tat-Proteinen der beiden Viren begründet liegt, wurde ihre Fähigkeit zur IL-2-Induktion verglichen. Der Luciferase-Assay in Abbildung 3.11 zeigt, dass sich SIVagm3-Tat und HIV-1(NL4-3)-Tat bezüglich der Aktivierung der IL-2-Promotor-kontrollierten Transkription nicht signifikant unterschieden. Die unterschiedlich starke IL-2-Induktion der beiden Virusstämme liegt also nicht im Tat-Protein begründet.

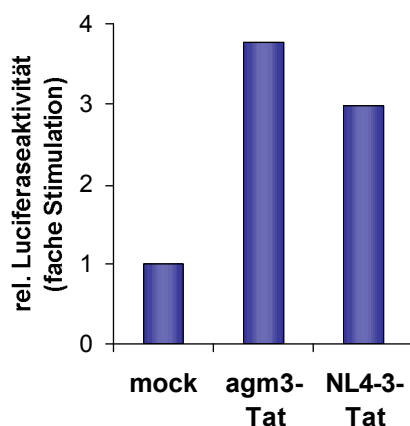
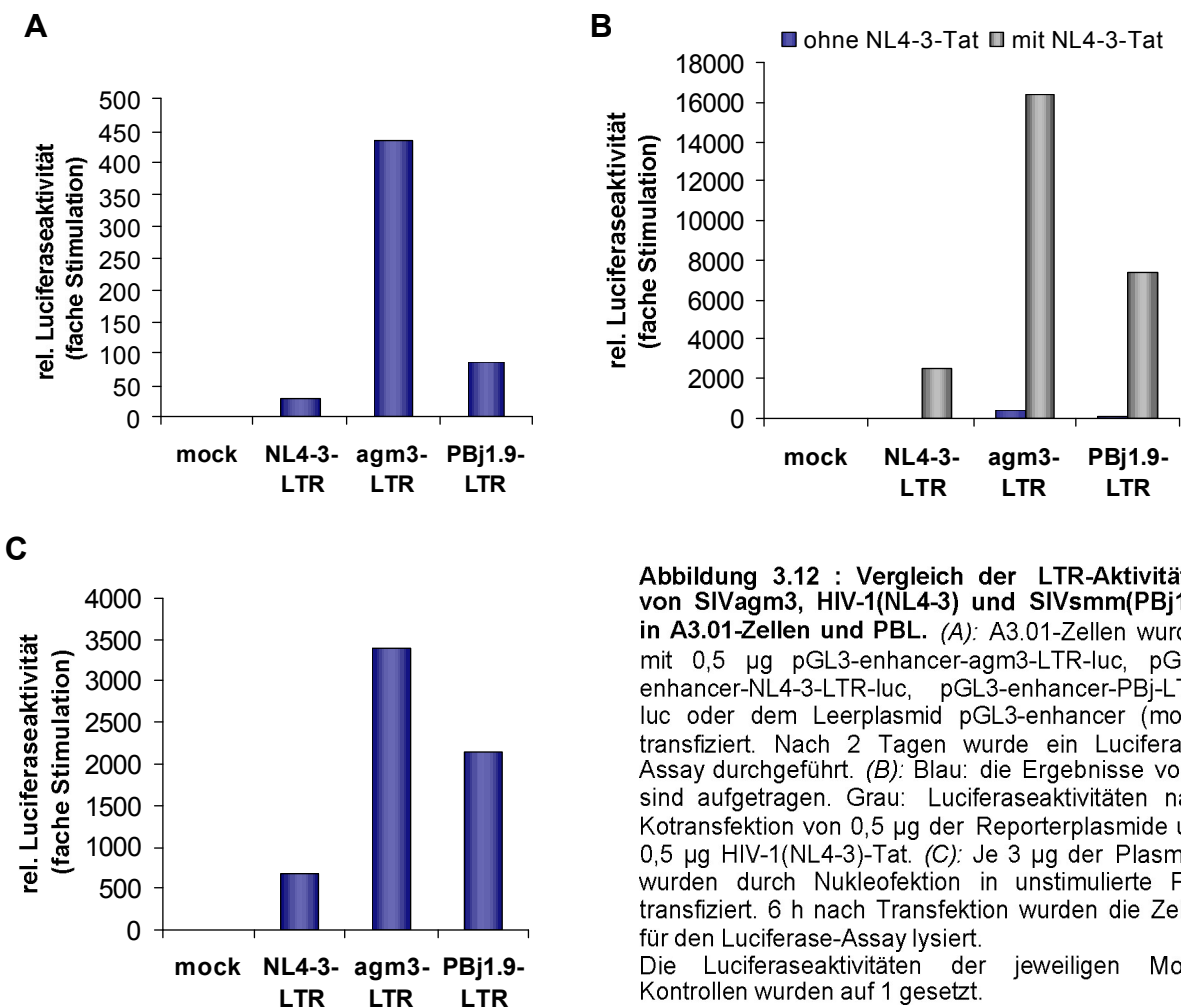


Abbildung 3.11 : Vergleich der IL-2-Induktion durch SIVagm3-Tat und HIV-1(NL4-3)-Tat. Je 2 µg der Tat-Expressionsplasmide oder des Leerplasmids (mock) wurden mit 0,5 µg IL-2-luc in A3.01-Zellen kotransfiziert. Alle Zellen wurden 15 h vor der Lyse für den Luciferase-Assay mit 20 ng/ml TPA und 0,5 µM Ionomycin stimuliert. Die Mock-Kontrolle wurde auf 1 gesetzt.

3.1.8. Vergleich der LTR-Aktivitäten von SIVagm3, HIV-1(NL4-3) und SIVsmm(PBj1.9)

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche IL-2-Induktion durch SIVagm3 und HIV-1(NL4-3) könnte eine unterschiedlich starke Expression der verantwortlichen Genprodukte sein. Da die Expression der viralen Gene über den LTR-Promotor reguliert wird, kann die Aktivität dieses Promotors einen Hinweis auf die Stärke der Genexpression geben.

Um die Promotorstärke von SIVagm3 und HIV-1(NL4-3) zu untersuchen, wurden Reporterplasmide verwendet, in denen die Luciferaseexpression durch die jeweilige LTR-Region kontrolliert wird (pGL3-enhancer-agm3-LTR-luc und pGL3-enhancer-NL4-3-LTR-luc). Zum Vergleich wurde auch der Promotor des SIVsmm(PBj1.9) - eines akut pathogenen SIV-Stammes - untersucht (pGL3-enhancer-PBj1.9-LTR-luc). Die entsprechenden Plasmide bzw. das leere Plasmid pGL3-enhancer wurden in A3.01-Zellen transfiziert, worauf nach 2 Tagen ein Luciferase-Assay durchgeführt wurde. Abbildung 3.12 A zeigt, dass die basale Aktivität der SIVagm3-LTR mit über 400-fach im Vergleich zum Leerplasmid sehr hoch war. Dagegen wies HIV-1(NL4-3) nur eine 30-fache und SIVsmm(PBj1.9) eine etwa 80-fache



Promotoraktivität auf. Zusätzliche Expression des HIV-1(NL4-3)-Transaktivators Tat in diesen Zellen verstärkte die LTR-Aktivitäten von HIV-1 und SIVsmm(PBj1.9) um den Faktor 80-90, während die transkriptionelle Aktivität der SIVagm3-LTR um den Faktor 40 erhöht wurde (Abb. 3.12 B). Die LTR-Aktivitäten wurden auch in primären humanen Zellen untersucht. Dazu wurden unstimulierte periphere Blutlymphozyten (PBL) zwei Tage nach Isolierung durch Nukleofektion mit den LTR-Luciferase-Plasmiden transfiziert. Nach 6 h wurde die Luciferase-Aktivität bestimmt (Abb. 3.12 C). Auch in PBL zeigte sich eine sehr hohe transkriptionelle Aktivität der untersuchten LTR-Regionen. Für den SIVagm3-Promotor wurde eine 3400-fache Aktivität im Vergleich zum leeren Plasmid festgestellt. Im Vergleich dazu waren die transkriptionellen Aktivitäten der HIV-1(NL4-3)- und PBj-LTRs mit Faktor 670 bzw. Faktor 2100 auch in diesen Zellen deutlich geringer, obwohl der Abstand zu dem SIVagm3-Promotor kleiner war als in A3.01-Zellen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die untersuchten Promotoren eine sehr hohe basale Aktivität aufweisen, die durch Expression des HIV-1-Tat verstärkt werden kann. Sowohl in primären Zellen, wie auch in der T-Zelllinie A3.01 war die transkriptionelle Aktivität der SIVagm3-LTR deutlich höher als die der HIV-1(NL4-3)- oder PBj-LTR. Es ist daher denkbar, dass SIVagm3 einen größeren Einfluss auf die IL-2-Expression hat, weil die dafür verantwortlichen Proteine, wie zum Beispiel Tat, im Vergleich zu den anderen untersuchten Virusstämmen stärker exprimiert werden.

3.1.9. Tat als Phosphoprotein

3.1.9.1. Phosphorylierung von SIVagm3-Tat durch eine assoziierte Kinase

Die in Kapitel 3.1.7. beschriebenen Experimente zeigten, dass das Tat-Protein nur in stimulierten Zellen in der Lage war, die IL-2-Expression zu verstärken. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung wäre, dass MAP-Kinasen, die ja wie gezeigt an der SIVagm3-vermittelten IL-2-Induktion beteiligt sind, das Tat-Protein phosphorylieren. Um aufzuklären, ob Tat möglicherweise durch eine solche Phosphorylierung reguliert wird, wurde ein *in-vitro*-Kinase-Assay durchgeführt. Die MAP-Kinasen ERK2, JNK1/SAPK oder p38 wurden durch Immunpräzipitation (IP) mit spezifischen Antikörpern aus aktivierten A3.01-Zellen isoliert. Zur Aktivierung von ERK und JNK/SAPK wurden TPA und Ionomycin verwendet, zur Aktivierung von p38 wurden die Zellen zusätzlich mit Anisomycin stimuliert. Um zunächst den experimentellen Ansatz zu überprüfen, wurden die rekombinanten Proteine Elk-1 und ATF-2 als Substrate in der Kinase-Reaktion eingesetzt. Alle drei MAP-Kinasen waren in der Lage nach ihrer Isolierung aus stimulierten Zellen das jeweilige

Substrat Elk-1 oder ATF-2 zu phosphorylieren, wohingegen die Kinasen ohne Stimulation nur eine geringe Aktivität zeigten und die Substrate kaum phosphorylierten (Abb. 3.13 A).

Um die Phosphorylierung von Tat zu untersuchen, wurde HA-markiertes SIVagm3-Tat in 293T-Zellen exprimiert und durch eine α -HA-Immunpräzipitation von den übrigen Proteinen des Zellextrakts gereinigt. Der Kinase-Assay zeigte eine starke Phosphorylierung des 14,5 kDa großen Tat-Proteins, die aber unabhängig davon war, ob die MAP-Kinasen aus stimulierten oder unstimulierten Zellen isoliert worden waren. Dies deutet darauf hin, dass die beobachtete Phosphorylierung nicht auf MAP-Kinasen zurückzuführen ist, sondern auf eine andere Kinase, die bei der Immunpräzipitation ebenfalls isoliert wird.

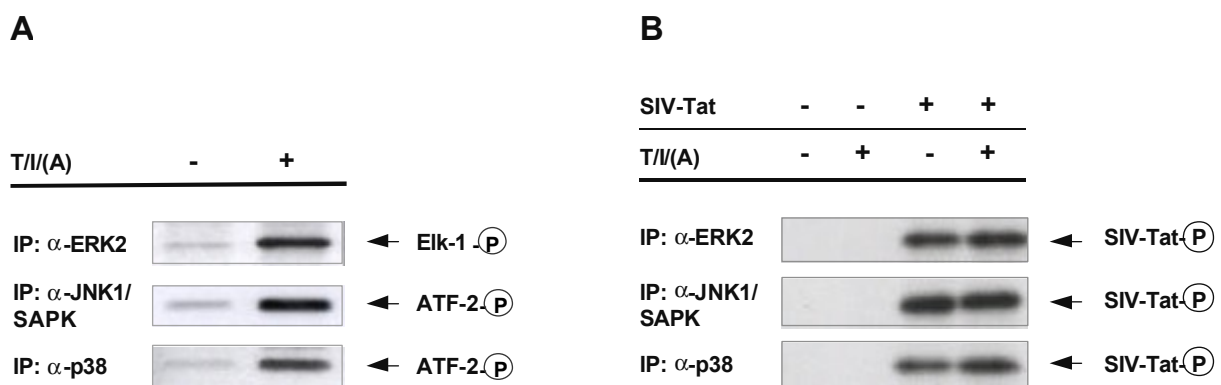


Abbildung 3.13 : Untersuchung einer Phosphorylierung von SIVagm3-Tat durch MAP-Kinasen. ERK2 und JNK1/SAPK wurden aus unstimulierten oder für 30 min. mit 100 ng/ml TPA und 0,5 μ M Ionomycin stimulierten (T/I) A3.01-Zellen immunpräzipitiert. p38 wurde aus unstimulierten oder für 30 min. mit TPA, Ionomycin und 10 μ g/ml Anisomycin stimulierten (T/I/A) A3.01-Zellen immunpräzipitiert. (A): Kontroll-Kinase-Assay mit je 1 μ g der rekombinanten Substrate Elk-1 oder ATF-2. (B): HA-markiertes SIVagm3-Tat wurde in 293T-Zellen exprimiert, mittels α -HA-Immunpräzipitation (IP) isoliert und als Substrat im Kinase-Assay eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde eine α -HA-IP mit untransfizierten Zellen durchgeführt.

Um zu untersuchen, ob eine Tat-assoziierte Kinase für diese Phosphorylierung verantwortlich ist, wurde ein Kinase-Assay durchgeführt, in welchem HA-markiertes SIVagm3-Tat für 30 oder 60 min. immunpräzipitiert wurde und die α -HA-Beads mit dem gebundenen Tat anschließend in Lysispuffer mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen gewaschen wurden. Tat wurde dann für einen Kinase-Assay eingesetzt, ohne dass eine weitere Kinase zugegeben wurde. Abbildung 3.14 zeigt, dass eine starke Phosphorylierung von Tat zu beobachten war, die auch durch Waschen mit hohen Salzkonzentrationen kaum reduziert wurde. Offensichtlich koimmunpräzipitiert SIVagm3-Tat mit einer assoziierten Kinase und wird durch diese phosphoryliert. Auch durch stringente Waschbedingungen mit bis zu 750 mM NaCl kann diese Kinase nicht abgelöst werden. Über eine Phosphorylierung durch die MAP-Kinasen kann anhand dieser Experimente keine Aussage gemacht werden, da aufgrund der starken Phosphorylierung durch die assoziierte Kinase möglicherweise eine

Phosphorylierung durch die MAP-Kinasen nicht mehr sichtbar ist. Daher wurde als nächstes untersucht, ob SIVagm3-Tat, das bakteriell exprimiert wurde und daher an keine zelluläre Kinase gebunden ist, durch MAPK phosphoryliert werden kann.

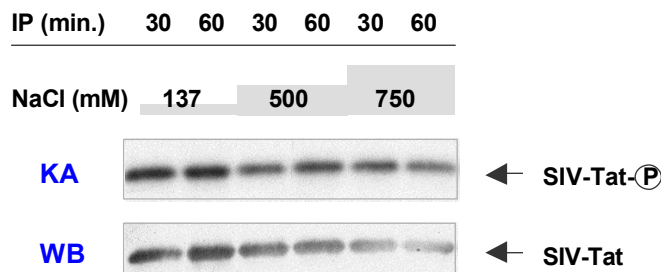
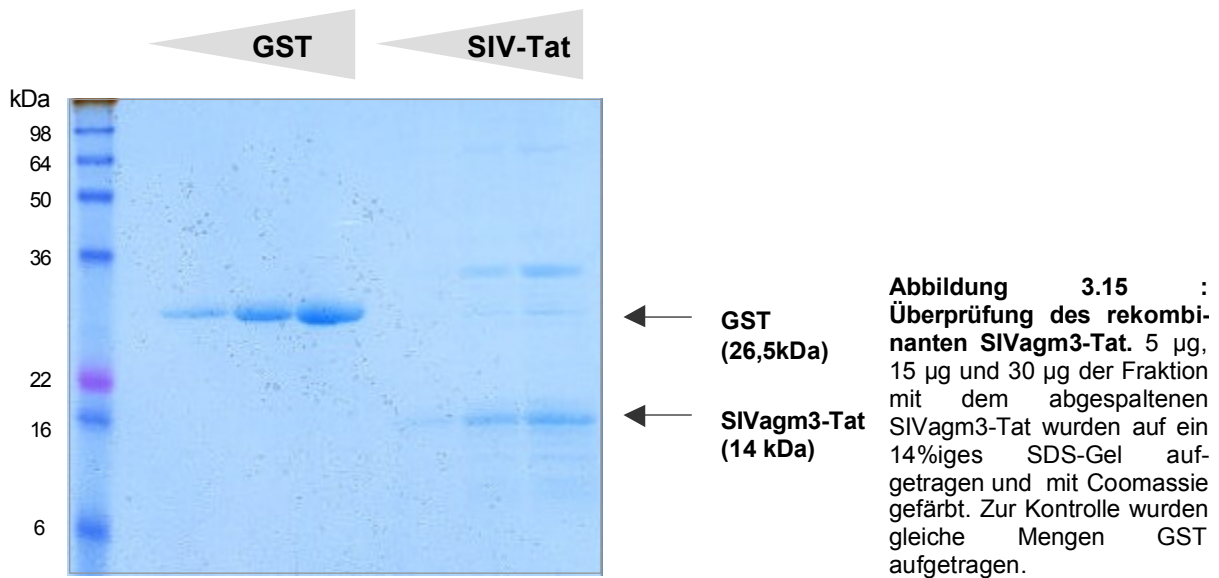


Abbildung 3.14 : Phosphorylierung von SIVagm3-Tat durch eine assoziierte Kinase. Für einen Kinase-Assay (KA) wurden 293T-Zellen mit 2 µg pBS-kRSPA-Tat_{SIVagm3} transfiziert. HA-Tat wurde für 30 oder 60 min. immunpräzipitiert, anschließend wurden die Beads 5-mal mit Lysisbuffer der angegebenen Salzkonzentrationen gewaschen. Die beads wurden dann mit Kinasepuffer und [³²P]ATP in einer Kinasereaktion inkubiert. Als Kontrolle wurde SIV-Tat im α-HA-Western Blot detektiert (WB).

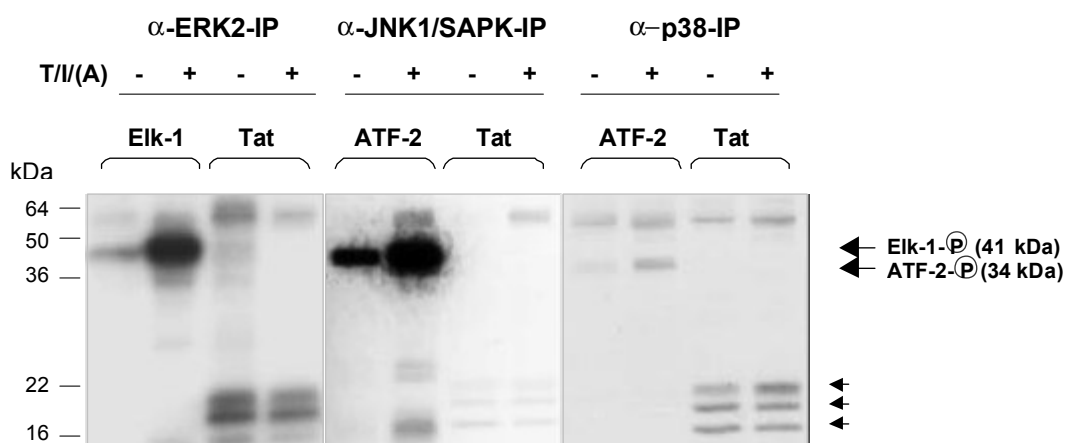
3.1.9.2. Herstellung von bakteriell exprimiertem SIVagm3-Tat

Um rekombinantes SIVagm3-Tat in Bakterien zu produzieren, musste zunächst ein SIVagm3-Tat-Expressionsplasmid hergestellt werden, das für die Proteinexpression in Bakterien geeignet ist. Dazu wurde das Tat-Insert aus dem Expressionsplasmid pBS-kRSPA-Tat_{SIVagm3} durch PCR amplifiziert, wobei über die Primer die Restriktionsschnittstellen *Bam*H I und *Eco*R I eingefügt wurden. Das Fragment wurde dann unter Verwendung dieser Restriktionsschnittstellen in pGEX-6P-2 - ein Plasmid, das für die Expression von GST (Glutathion-S-Transferase)-Fusionsproteinen in Bakterien verwendet wird - inseriert (pGEX-6P-2-Tat_{SIVagm3}). Das GST-SIVagm3-Tat-Fusionsprotein wurde dann in dem transformationskompetenten *E. coli*-Stamm BL21(DE3) (Stratagene, La Jolla, USA) exprimiert. Nach Ultraschall-Lyse der Bakterien wurde das Fusionsprotein mit Hilfe einer Glutathion-Säule aufgereinigt, worauf unter Ausnutzung einer speziellen Proteaseschnittstelle zwischen dem GST-Tag und Tat das gewünschte Protein abgespalten wurde. Das Eluat wurde in Fraktionen aufgefangen und durch Proteinbestimmung wurde die Fraktion mit dem abgespaltenen SIVagm3-Tat identifiziert. Nach Optimierung der Protease-vermittelten Spaltung konnten ausreichende Mengen des rekombinanten SIVagm3-Tat gewonnen werden. Abbildung 3.15 zeigt die Analyse des 14 kDa großen Proteins im SDS-Gel nach Abspaltung des GST-Tag.



3.1.9.3. Untersuchung einer Phosphorylierung des Tat-Proteins durch MAP-Kinasen

Wie in Kapitel 3.1.9.1. beschrieben, konnte eine mögliche Phosphorylierung von SIVagm3-Tat durch MAP-Kinasen aufgrund der starken Phosphorylierung durch die Tat-assoziierte Kinase nicht untersucht werden. In weiteren Kinase-Assays wurde nun anstelle des zellulär exprimierten Proteins das bakteriell exprimierte SIVagm3-Tat als Substrat für die MAP-



Kinasen ERK2, JNK/SAPK oder p38 eingesetzt. Die Kinasen wurden aus unstimulierten oder stimulierten A3.01-Zellen durch Immunpräzipitation isoliert und mit je 2 µg des rekombinanten SIVagm3-Tat in einer Kinase-Reaktion inkubiert. Abbildung 3.16 zeigt, dass alle Kinasen ihr spezifisches Kontrollsubstrat Elk-1 oder ATF-2 in Abhängigkeit von der Zellaktivierung phosphorylierten, wohingegen im Falle von SIVagm3-Tat keine MAPK-abhängige Phosphorylierung zu beobachten war. Es waren zwar drei relativ schwache Banden im Größenbereich zwischen 16 und 22 kDa sichtbar, aber diese waren unabhängig von der MAPK-Aktivität in gleicher Intensität vorhanden. Auch bei Verwendung des bakteriell exprimierten Proteins konnte also keine Phosphorylierung von SIVagm3-Tat durch Kinasen der MAPK-Familie beobachtet werden.

Um zu untersuchen, ob HIV-1-Tat durch MAP-Kinasen phosphoryliert werden kann, wurde mithilfe des Expressionsplasmids pBS-kRSPA-HA-Tat_{NL4-3} HA-markiertes HIV-1-Tat in 293T-Zellen exprimiert. Das Protein wurde durch α-HA-Immunpräzipitation aufgereinigt und als Substrat im MAP-Kinase-Assay eingesetzt. Wie der Assay in Abbildung 3.17 zeigt, wurde auch das 10,9 kDa große HIV-1(NL4-3)-Tat durch ERK2, JNK1/SAPK und p38 nicht phosphoryliert, eine schwache MAPK-unabhängige Phosphorylierung war dagegen zu beobachten.

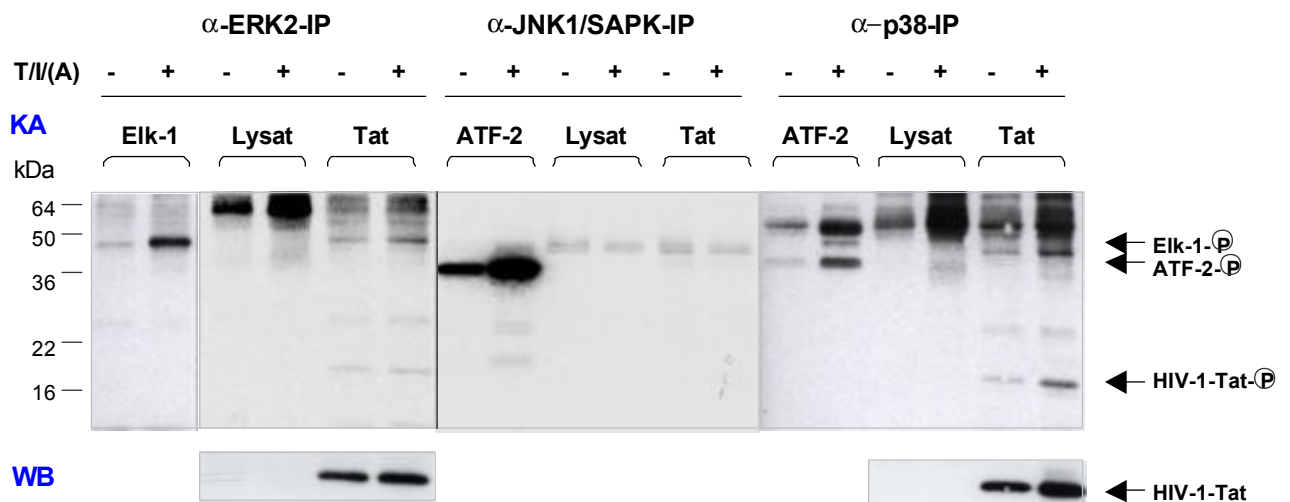


Abbildung 3.17 : Untersuchung einer Phosphorylierung von HIV-1-Tat durch MAP-Kinasen. ERK2 und JNK1/SAPK wurden aus unstimulierten oder für 30 min. mit 100 ng/ml TPA und 0,5 µM Ionomycin stimulierten (T/I) A3.01-Zellen, p38 aus unstimulierten oder für 30 min. mit TPA, Ionomycin und 10 µg/ml Anisomycin-stimulierten (T/I/A) A3.01-Zellen immunpräzipitiert. HA-markiertes HIV-1(NL4-3)-Tat wurde in 293T-Zellen exprimiert, mittels α-HA-Immunpräzipitation (IP) isoliert und als Substrat im Kinase-Assay (KA) eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde die IP mit untransfizierten Zellen durchgeführt (Lysat). Die Substrate Elk-1 und ATF-2 dienten als Positivkontrolle. Das Vorhandensein von HIV-1-Tat wurde im α-HA-Western Blot nachgewiesen (WB).

MAP-Kinasen phosphorylieren ihre Substrate in der Regel an Serinen und Threoninen, die vor einem Prolin stehen. Dieses minimale Konsensusmotiv findet sich in den Tat-Proteinen von SIVagm3 und HIV-1(NL4-3) nicht, dagegen enthält HIV-2(BEN)-Tat mehrere solcher Motive (siehe Abb. 1.3). Daher wurde die MAPK-induzierte Phosphorylierung von HIV-2-Tat ebenfalls untersucht. Zunächst wurde das Expressionsplasmid pBS-kRSPA-HA-Tat_{HIV2BEN} konstruiert, wobei als Ausgangsplasmid der molekulare Klon von HIV-2(BEN) zur Verfügung stand. Die Konstruktion wurde zunächst analog der in Kapitel 3.1.6. beschriebenen Vorgehensweise durchgeführt. Da die Ligation des Tat-Inserts über die eingefügten Restriktionsschnittstellen *Xho* I und *Spe* I mit dem pBS-kRSPA-Plasmid nicht erfolgreich war, wurde die Tat-Sequenz zunächst durch T/A-Klonierung in den pTargetT-Vektor (Promega, Mannheim) eingesetzt und dann über die Restriktionsschnittstellen *Xho* I und *Not* I in pBS-kRSPA inseriert.

Anschließend wurde mit dem HA-markierten HIV-2(BEN)-Tat ein Kinase-Assay wie zuvor beschrieben durchgeführt. Auch das 15,6 kDa große HIV-2(BEN)-Tat wurde durch eine assoziierte Kinase phosphoryliert, wie in Abbildung 3.18 deutlich zu erkennen ist, nicht aber durch MAP-Kinasen.

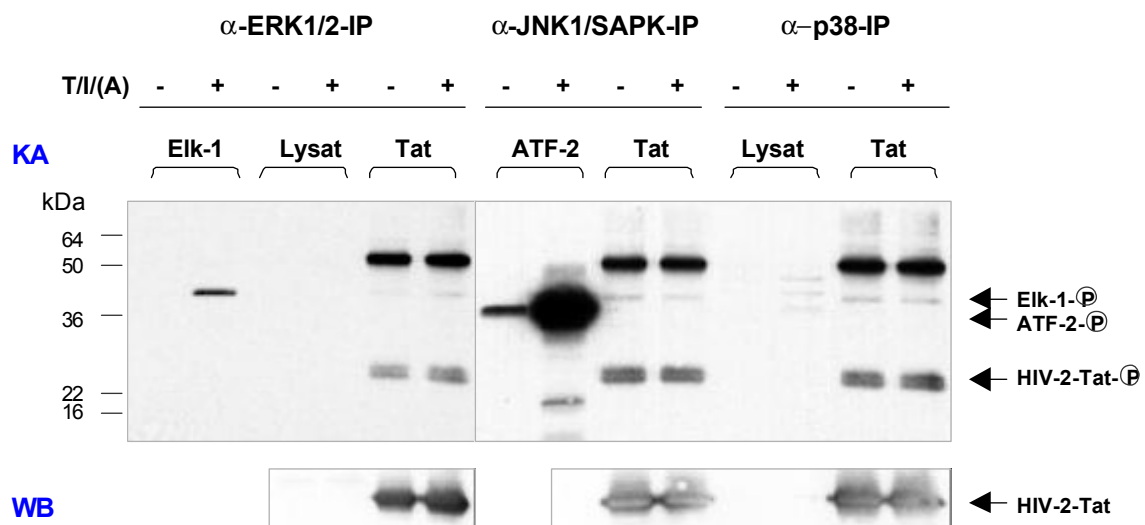


Abbildung 3.18 : Untersuchung einer Phosphorylierung von HIV-2-Tat durch MAP-Kinasen. ERK1/2 und JNK1/SAPK wurden aus unstimulierten oder für 30 min. mit 100 ng/ml TPA und 0,5 µM Ionomycin stimulierten (T/I) A3.01-Zellen immunpräzipitiert. p38 wurde aus unstimulierten oder mit TPA, Ionomycin und 10 µg/ml Anisomycin stimulierten (T/I/A) A3.01-Zellen immunpräzipitiert. HA-markiertes HIV-2-BEN-Tat wurde in 293T-Zellen exprimiert, mittels α-HA-Immunpräzipitation (IP) isoliert und als Substrat im Kinase-Assay (KA) eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde die IP mit untransfizierten Zellen durchgeführt (Lysat). Die Substrate Elk-1 und ATF-2 dienten als Positivkontrolle. Das Vorhandensein von HIV-2-Tat wurde im α-HA-Western Blot nachgewiesen (WB).

Die Ergebnisse dieser Phosphorylierungsstudien zeigen, dass die Tat-Proteine der untersuchten Virusstämme SIVagm3, HIV-1(NL4-3) und HIV-2(BEN) nicht durch ERK, JNK/SAPK oder p38 phosphoryliert werden, dagegen wurde insbesondere bei SIVagm3-Tat und HIV-2-Tat eine starke Phosphorylierung durch eine assoziierte Kinase beobachtet. Daraus lässt sich schließen, dass die Fähigkeit des Tat-Proteins die IL-2-Expression in stimulierten Zellen zu verstärken, nicht auf eine direkte Phosphorylierung von Tat durch die untersuchten MAP-Kinasen zurückzuführen ist.

3.1.9.4. Phosphorylierung von SIVagm3-Tat in verschiedenen Zelllinien

Die Phosphorylierung von SIVagm3-Tat durch eine assoziierte Kinase war nach Expression des Proteins in der humanen Nierenzelllinie 293T beobachtet worden. Experimente mit den Nierenzelllinien CV-1 und COS-7 der Afrikanischen Grünen Meerkatze (Genus *Chlorocebus*) und der murinen Fibroblastenzelllinie NIH3T3 sollten nun zeigen, ob diese Phosphorylierung vom Zelltyp abhängig ist. Außerdem wurde untersucht, ob die unbekannte Kinase durch den Aktivierungsstimulus TPA/Ionomycin induzierbar ist. Dazu wurde das Expressionsplasmid pBS-kRSPA-HA-Tat_{SIVagm3} in 293T-, NIH3T3-, CV-1- oder COS-7-Zellen transfiziert. Nach zwei Tagen wurde je die Hälfte der Zellen für 45 min. mit TPA/Ionomycin stimuliert und anschließend für eine Immunpräzipitation mit HA-spezifischen Antikörpern lysiert. Die α -HA-Beads wurden dann mit [γ -³³P]ATP in Kinase-Puffer inkubiert.

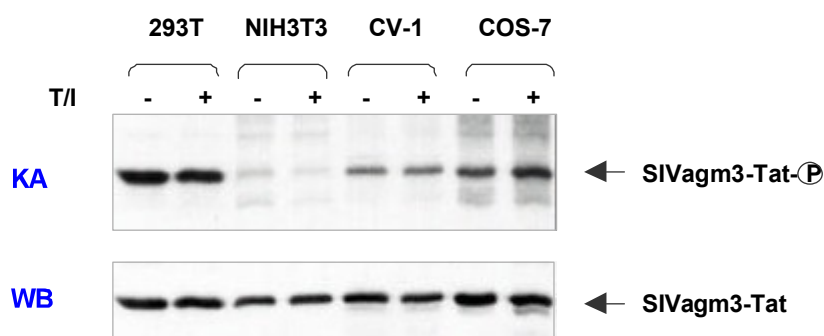


Abbildung 3.19 :
Phosphorylierung von SIVagm3-Tat in verschiedenen Zelllinien.
 SIVagm3-HA-Tat wurde in den angegebenen Zelllinien exprimiert. Nach Stimulation eines Teils der Zellen für 45 min. mit 100 ng/ml TPA und 0,5 μ M Ionomycin (T/I) wurde eine α -HA-IP durchgeführt. Das immunpräzipitierte Tat wurde in einer Kinase-Reaktion mit [γ -³³P]ATP inkubiert (KA). Das Vorhandensein von Tat wurde mittels α -HA-Western Blot überprüft (WB).

Der durchgeführte Kinase-Assay zeigte eine Phosphorylierung des Tat-Proteins in 293T-, CV-1- und COS-7-Zellen, also in den humanen und simianen Nierenzelllinien (Abb. 3.19). Stimulation mit TPA und Ionomycin hatte keinen Einfluss auf die Stärke der Phosphorylierung. Interessanterweise wurde SIVagm3-Tat in der murinen

Fibroblastenzelllinie NIH3T3 zwar gut exprimiert, wie der Western Blot zeigte, im Kinase-Assay war jedoch nur eine sehr schwache Bande erkennbar. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die unbekannte Kinase in den Mausfibroblasten entweder nicht vorhanden ist oder nicht an das virale Tat bindet. In Kapitel 1.2.3. wurde beschrieben, dass Tat bei der LTR-Transaktivierung den CDK9/Cyclin T1-Komplex an die TAR-Region rekrutiert. In murinen Zellen kann dieser Komplex jedoch nicht an Tat binden, weshalb in diesen Zellen keine HIV-Replikation möglich ist (Yang et al. 1996). Da im Falle von SIVagm3-Tat, wie Abbildung 3.19 zeigt, keine Phosphorylierung in murinen NIH3T3-Zellen stattfand, widersprechen diese Daten nicht der Vermutung, dass es sich bei der SIVagm3-Tat-assoziierten Kinase um CDK9 handeln könnte.

3.1.9.5. Phosphorylierung von SIVagm3-Tat durch die Cyclin-abhängige Proteinkinase 9

Um die Hypothese zu überprüfen, ob es sich bei der Tat-assoziierten Kinase um die Cyclin-abhängige Proteinkinase 9 (CDK9) handelt, wurde untersucht, ob SIVagm3-Tat durch CDK9 phosphoryliert werden kann. Hierzu wurde bakteriell exprimiertes SIVagm3-Tat verwendet, da das zelluläre Tat ja bereits an die unbekannte Kinase gebunden ist. Aktive CDK9 wurde mittels Immunpräzipitation aus 293T-Zellen isoliert und mit rekombinantem SIVagm3-Tat in einer Kinase-Reaktion inkubiert. Als Kontrolle wurde die Immunpräzipitation auch ohne den CDK9-spezifischen Antikörper durchgeführt. Der Kinase-Assay zeigte ein starkes Phosphorylierungssignal, das nur dann erschien, wenn der CDK9-Antikörper während der Immunpräzipitation vorhanden war (Abb. 3.20). Durch Western Blot-Analyse mit dem Antiserum eines SIVagm3-infizierten Schweinsaffen (*Macaca nemestrina*) konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei dieser Bande um SIVagm3-Tat handelte.

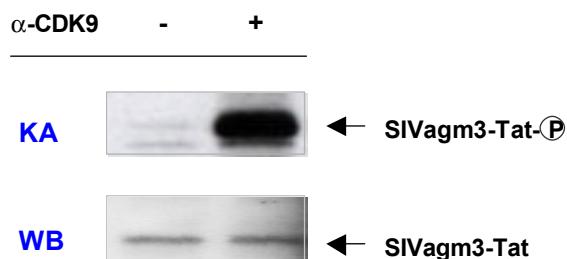


Abbildung 3.20 : Phosphorylierung von SIVagm3-Tat durch CDK9. Aktive CDK9 wurde durch Immunpräzipitation aus 293T-Zellen isoliert. 2 µg des bakteriell exprimierten SIVagm3-Tat wurden als Substrat im CDK9-Kinase-Assay eingesetzt (KA). Als Negativkontrolle wurde die IP auch ohne den CDK9-spezifischen Antikörper durchgeführt. Mit einem SIVagm3-Antiserum wurde die Identität der Bande im Western Blot überprüft (WB).

Als nächstes wurde untersucht, ob die Assoziation von CDK9 und SIVagm3-Tat nachgewiesen werden kann. Zu diesem Zwecke wurde HA-markiertes SIVagm3-Tat in 293T-

Zellen exprimiert. Zwei Tage nach der Transfektion wurde mit dem Zelllysate eine α -HA-Immunpräzipitation durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde auch das Lysat nicht-transfizierter Zellen für eine α -HA-Immunpräzipitation eingesetzt. Anschließend folgte ein Western Blot gegen CDK9. Als Positivkontrolle wurde CDK9 aus 293T-Zellen immunpräzipitiert und im α -CDK9-Western Blot detektiert. Der Western Blot in Abbildung 3.21 zeigt, dass CDK9 nach der Immunpräzipitation von SIVagm3-Tat deutlich nachgewiesen werden konnte, wohingegen in der Probe ohne Tat kein CDK9 detektiert wurde. Die Ergebnisse der beiden Experimente zeigen, dass es sich bei der Tat-assoziierten Kinase um CDK9 handelt, da diese Kinase mit SIVagm3-Tat koimmunpräzipitiert und zudem eine Phosphorylierung des rekombinanten Tat-Proteins durch CDK9 gezeigt werden konnte.

IP	CDK9	HA	HA
SIV-Tat	-	-	+

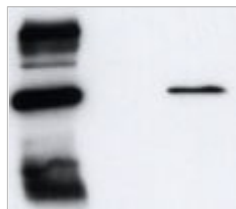


Abbildung 3.21 : Koimmunpräzipitation von SIVagm3-Tat und CDK9. 293T-Zellen wurden mit 2 μ g pBS-kRSPA-HA-Tat_{SIVagm3} transfiziert. Nach α -HA-Immunpräzipitation aus transfizierten oder nicht-transfizierten Zellen folgte ein α -CDK9-Western Blot. Als Positivkontrolle wurde CDK9 immunpräzipitiert.

3.1.9.6. Einfluss der Depletion verschiedener CDKs auf die SIVagm3-Tat-Phosphorylierung

Unter der Voraussetzung, dass es sich bei der Tat-assoziierten Kinase um CDK9 handelt, müsste nach Depletion dieser Kinase aus dem Zelllysate die Phosphorylierung im Kinase-Assay nicht mehr detektierbar sein. Um dies zu testen, wurden 293T-Zellen mit pBS-kRSPA-HA-Tat_{SIVagm3} transfiziert und nach zwei Tagen lysiert. Zum Entfernen von CDK9 aus dem Zelllysate wurde die Kinase mit auf ProteinA/G-Beads immobilisierten CDK9-Antikörpern immunpräzipitiert. Es wurden vier solcher Depletionsrunden unter Verwendung jeweils neuer Beads und CDK9-Antikörper durchgeführt. Als Negativkontrolle wurden die Depletionen nur mit Beads, aber ohne CDK9-Antikörper durchgeführt. Anschließend wurde SIVagm3-Tat durch eine α -HA-Immunpräzipitation isoliert und in einem Kinase-Assay eingesetzt. Zur Detektion auch des nicht-phosphorylierten Tat wurde dann ein α -HA-Western Blot durchgeführt. Um die abnehmende CDK9-Konzentration im Zelllysate zu verfolgen, wurde mit den Beads aus den Depletionsrunden ein α -CDK9-Western Blot durchgeführt.

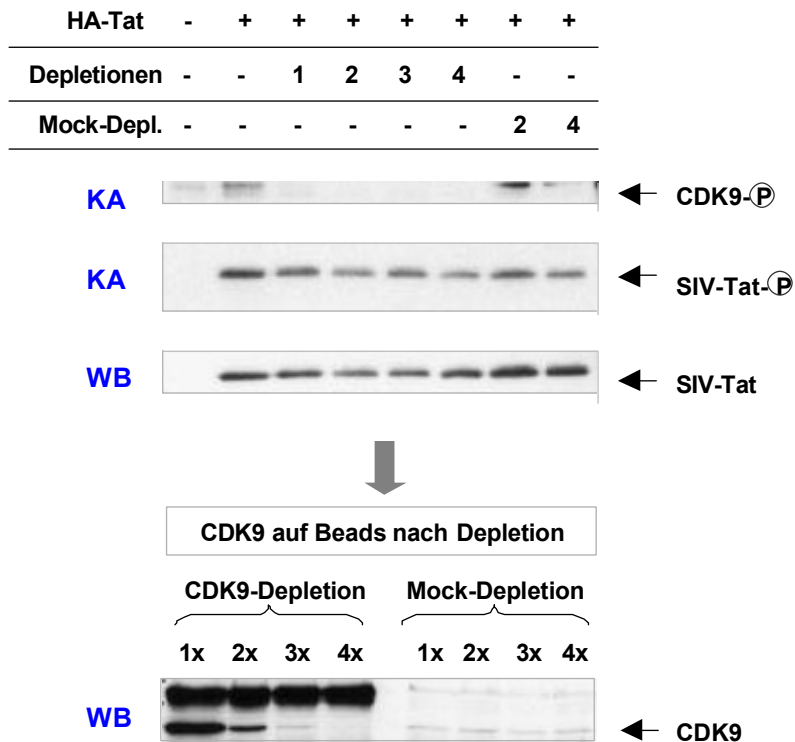


Abbildung 3.22 :
Phosphorylierung von SIVagm3-Tat nach CDK9-Depletion. Aus dem Lysat SIVagm3-HA-Tat-transfizierter Zellen wurde in 4 Depletionsrunden CDK9 entfernt. Die Mock-Depletion wurde nur mit Beads, ohne CDK9-Antikörper durchgeführt. Anschließend wurde SIVagm3-Tat immunpräzipitiert und in einer Kinase-Reaktion mit [γ - 33 P]ATP inkubiert (KA). Als Kontrolle wurden ein α -HA-Western Blot durchgeführt (WB). Mit den Beads aus den Depletionsrunden wurde ein α -CDK9-Western Blot durchgeführt (WB).

Überraschenderweise blieb die Phosphorylierung von SIVagm3-Tat auch nach vier Depletionsrunden bestehen (Abb. 3.22). Die Western Blot-Analysen mit den α -CDK9-Beads zeigten, dass bereits bei der dritten Depletionsrunde kein CDK9 mehr immunpräzipitiert wurde, die Kinase also vollständig aus dem Zelllysate entfernt worden war. Die erfolgreiche Depletion der CDK9 wurde auch durch die Beobachtung der bereits von Yang et al. (1996) beschriebenen Autophosphorylierung von CDK9 bestätigt. Der Kinase-Assay in Abbildung 3.22 zeigt, dass die Autophosphorylierung der CDK9 bereits nach einer Depletionsrunde nicht mehr zu sehen war, bei der Mock-Depletion blieb sie dagegen vorhanden. Damit scheinen neben CDK9 zusätzliche Kinasen vorhanden zu sein, die SIVagm3-Tat phosphorylieren. Als weitere Tat-assoziierte Kinasen sind CDK2 und CDK7 beschrieben, wobei zumindest CDK2 in der Lage ist das Tat-Protein von HIV-1 zu phosphorylieren (Cujec et al. 1997, Nekhai et al. 2002). Um festzustellen, ob eine dieser Kinasen für die verbleibende SIVagm3-Tat-Phosphorylierung nach Depletion der CDK9 verantwortlich ist, wurde ein weiteres Depletionsexperiment durchgeführt.

Der Versuch wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt, diesmal wurden allerdings neben CDK9 auch CDK2 und CDK7 depletiert. Der Kinase-Assay zeigte auch nach Depletion der drei Kinasen eine fast unveränderte Phosphorylierung des SIVagm3-Tat (Abb. 3.23), obwohl die Kontroll-Western Blots eine vollständige Entfernung der CDKs aus dem Zelllysate

nachwiesen. Damit zeigen die Ergebnisse, dass neben CDK9 noch mindestens eine weitere unbekannte SIVagm3-Tat-assoziierte Kinase existiert, die das virale Protein phosphoryliert.

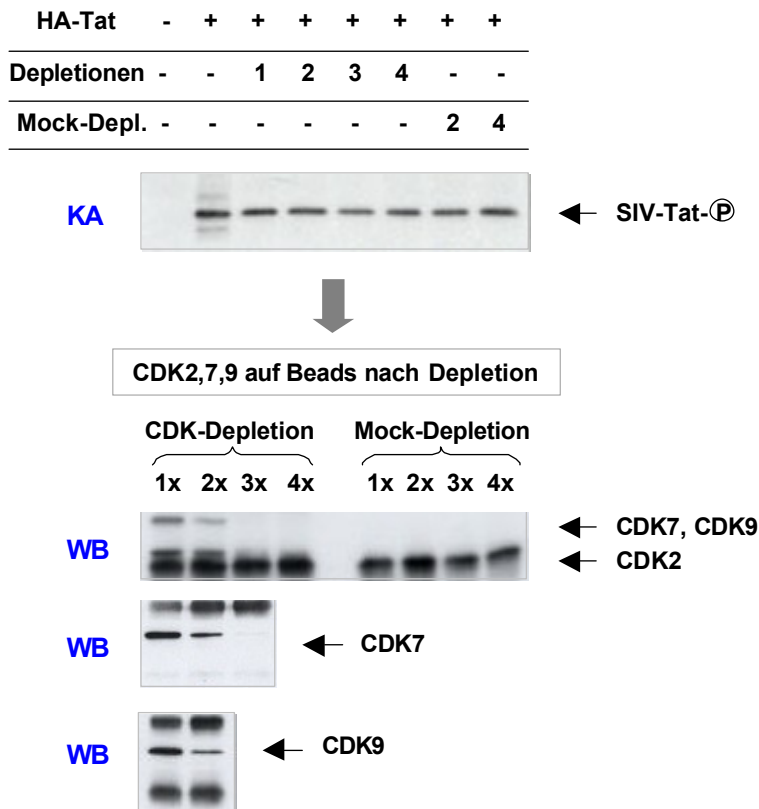


Abbildung 3.23 :
Phosphorylierung von SIVagm3-Tat nach Depletion von CDK2, CDK7 und CDK9.
 Aus dem Lysat pBS-kRSPA-HA-Tat_{SIVagm3}-transfizierter 293T-Zellen wurden CDK2, CDK7 und CDK9 in 4 Depletionsrunden entfernt. Die Mock-Depletion wurde nur mit Beads, ohne die spezifischen CDK-Antikörper durchgeführt. Aus dem CDK-depletierten Lysat wurde HA-SIVagm3-Tat immunpräzipitiert und in einer Kinase-Reaktion mit [γ -³³P]ATP inkubiert (KA). Die depletierten Kinasen wurden durch Western Blots auf den Beads nachgewiesen (WB).

3.1.10. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die im ersten Teil dieser Arbeit erzielten Resultate zeigen, dass SIVagm3 in suboptimal stimulierten T-Zellen die Sekretion von Interleukin-2 verstärken kann. Im Kontext der klassischen T-Zellaktivierung sind drei Signalkaskaden für die IL-2-Induktion essentiell: die MAPK-Signalkaskaden, der NF- κ B-Signalweg und der Calcineurin/NF-AT-Signalweg. SIVagm3 verwendet jedoch einen alternativen Mechanismus der IL-2-Induktion. Die SIVagm3-vermittelte IL-2-Induktion ist zwar von der Aktivität der MAP-Kinasen abhängig und eine Aktivierung der NF- κ B-abhängigen Transkription durch SIVagm3 wurde beobachtet, aber der essentielle Calcineurin/NF-AT-Signalweg ist an der SIVagm3-stimulierten IL-2-Genexpression interessanterweise nicht beteiligt.

Wie im Falle von HIV-1 bereits beschrieben, konnte auch für SIVagm3 gezeigt werden, dass das Tat-Protein durch Aktivierung des CD28-responsiven Elements im IL-2-Promotorbereich die IL-2-Expression verstärken kann. Da dies nur in stimulierten Zellen beobachtet werden

konnte, müssen jedoch weitere virale Faktoren an der SIVagm3-vermittelten IL-2-Induktion beteiligt sein. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung wäre die Regulation der Tat-Funktion durch eine MAPK-vermittelte Phosphorylierung, da MAPK ja nur in stimulierten Zellen aktiv sind. Die Phosphorylierungsstudien mit den Tat-Proteinen von SIVagm3, HIV-1(NL4-3) und HIV-2(BEN) zeigten jedoch keine Phosphorylierung durch MAP-Kinasen. Dagegen konnte gezeigt werden, dass SIVagm3-Tat durch die assoziierte Kinase CDK9 phosphoryliert wird und dass es neben CDK9 mindestens eine weitere Tat-assoziierte Kinase gibt, die SIVagm3-Tat ebenfalls phosphorylieren kann.

3.2. Wechselwirkung der mitogenen Signalkaskade mit der Apobec3G-Expression

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Expression eines weiteren zellulären Proteins untersucht, das ebenfalls eine sehr wichtige Rolle bei der Replikation der Immundefizienzviren spielt. Apobec3G wurde erst kürzlich als zellulärer Gegenspieler des lentiviralen Vif-Proteins identifiziert, das in die entstehenden Viruspartikel eingebaut wird und die Infektiosität dieser Viren stark reduziert (Sheehy et al. 2002). Vif kann die Funktion des antiviralen Faktors jedoch neutralisieren, indem es den Abbau von Apobec3G im Proteasom induziert und die Inkorporation des Proteins in die Viruspartikel verhindert (Marin et al. 2003, Sheehy et al. 2003, Yu et al. 2003). Die antivirale Funktion von Apobec3G, die auf seiner DNA-Deaminase-Aktivität beruht, konnte bereits weitgehend aufgeklärt werden (Harris et al. 2003, Mangeat et al. 2003), über die Regulation von Apobec3G ist dagegen noch wenig bekannt. Um erste Erkenntnisse über die Regulation von Apobec3G zu gewinnen, wurde in diesem Teil der Arbeit untersucht, ob die mitogene Raf/MEK/ERK-Signalkaskade mit der Expression von Apobec3G bzw. der Vif-induzierten Apobec3G-Degradation interferiert.

3.2.1. Einfluss der Zellaktivität auf die Apobec3G-Expression

Im folgenden Experiment wurde untersucht, ob die Expression von Apobec3G oder der Vif-induzierte Abbau von Apobec3G durch den Aktivierungsstatus der Zellen beeinflusst werden. Dazu wurde die mitogene Raf/MEK/ERK-Signalkaskade durch TPA aktiviert oder durch den spezifischen MEK-Inhibitor U0126 inhibiert. Für die Expression von Vif wurde ein modifiziertes HIV-1(NL4-3) verwendet, in welchem die *env*- und *vpr*-Gene durch Mutationen inaktiviert sind und welches zusätzlich ein Luciferase-Gen in der *nef*-Region enthält (NL4-3-luc). Dieses Plasmid oder das *vif*-deletierte Analogon NL4-3-luc Δ vif wurden mit dem

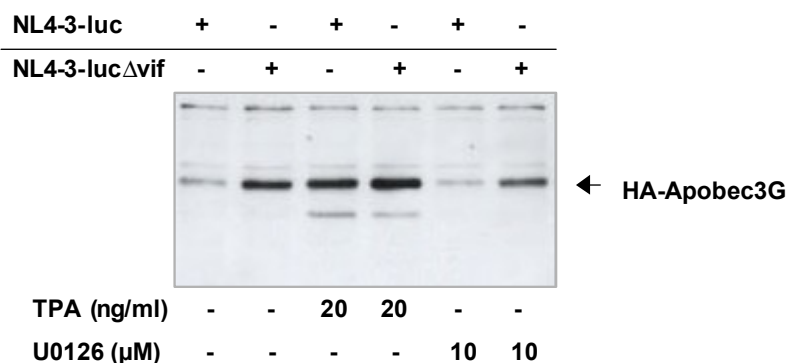


Abbildung 3.24 : Einfluss von TPA und U0126 auf die Apobec3G-Konzentration.

293T-Zellen wurden mit 2 μ g pcDNA3.1-HA-CEM15 und 2 μ g NL4-3-luc bzw. NL4-3-luc Δ vif kotransfiziert. Die Zellen blieben unbehandelt oder wurden für 6 h mit 20 ng/ml TPA oder für 15 h mit 10 μ M U0126 inkubiert. Nach 2 Tagen wurden die Zellen für einen α -HA-Western Blot lysiert.

humanen Apobec3G-Expressionsplasmid pcDNA3.1-HA-CEM15 in 293T-Zellen transfiziert. Die Stimulation mit TPA erfolgte 6 h vor der Zellyse, der MEK-Inhibitor U0126 wurde 15 h vor der Lyse zugegeben. Mit den Zelllysaten wurde ein α -HA-Western Blot durchgeführt. Abbildung 3.24 zeigt, dass die Stimulation mit TPA zu einer verstärkten Expression von Apobec3G führte, während die Behandlung mit U0126 die Apobec3G-Expression reduzierte. Die Koexpression mit Vif führte erwartungsgemäß zu einer Verminderung der Apobec3G-Konzentration im Zelllysate, dies war jedoch unabhängig von der Behandlung der Zellen mit TPA oder U0126 zu beobachten (siehe auch Abb. 3.25 und Abb. 3.27). Diese Ergebnisse zeigen, dass durch Aktivierung der mitogenen Signalkaskade die Expression von Apobec3G verstärkt wurde, wohingegen der Vif-induzierte Abbau von Apobec3G von der mitogenen Aktivierung unabhängig war. Die durch TPA verstärkte Apobec3G-Expression war, wie weitere Experimente zeigten, in einem Zeitraum von 6-16 h nach Stimulation zu beobachten (nicht gezeigt).

3.2.2. Rolle der Proteinkinase C bei der TPA-induzierten Apobec3G-Expression

Der Phorbol ester TPA wirkt als direkter Aktivator der Proteinkinase C, die ihrerseits den mitogenen Raf/MEK/ERK-Signalweg aktiviert (Tan et al. 2003). Inhibition der PKC sollte den Einfluss von TPA auf die Apobec3G-Expression also blockieren. Um dies zu untersuchen, wurden die PKC-Inhibitoren Staurosporin, Gö6983 und Gö6976 verwendet. 293T-Zellen wurden mit pcDNA3.1-HA-CEM15 und NL4-3-luc bzw. NL4-3-luc Δ vif kotransfiziert. 15 h vor

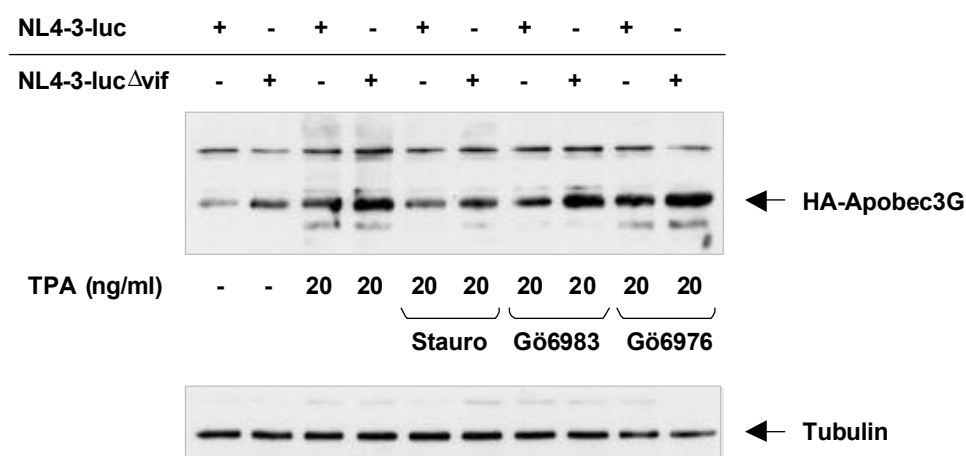


Abbildung 3.25 : Einfluss von PKC-Inhibitoren auf die TPA-induzierte Apobec3G-Expression. 293T-Zellen wurden mit 2 μ g pcDNA3.1-HA-CEM15 und 2 μ g NL4-3-luc bzw. NL4-3-luc Δ vif kotransfiziert. 30 min. vor Stimulation mit 20 ng/ml TPA wurden die Zellen mit 40 nM Staurosporin, 1 μ M Gö6983 oder 1 μ M Gö6976 behandelt. 15 h nach Stimulation und 48 h nach Transfektion erfolgte die Lyse für einen α -HA-Western Blot. Als Beladungskontrolle wurde Tubulin im Western Blot detektiert.

der Zellyse und 30 min. vor Beginn der TPA-Stimulation wurden die Zellen mit den verschiedenen PKC-Inhibitoren behandelt. Der anschließende α -HA-Western Blot zeigte, dass Staurosporin den Einfluss von TPA auf die Apobec3G-Expression aufhob (Abb. 3.25). Gö6983 zeigte weniger Wirkung, konnte den Einfluss von TPA aber reduzieren, während nach Behandlung mit Gö6976 das Apobec3G-Signal unverändert blieb. Diese Ergebnisse zeigen, dass durch Inhibition der Proteinkinase C der aktivierende Einfluss von TPA auf die Apobec3G-Expression blockiert werden kann.

Um zu untersuchen, ob die TPA-Stimulation zu einer direkten Phosphorylierung von Apobec3G durch die PKC führt, wurde ein Kinase-Assay durchgeführt. HA-markiertes Apobec3G wurde in 293T-Zellen exprimiert und nach einer α -HA-Immunpräzipitation als Substrat für die aktive PKC eingesetzt. Als Positivkontrolle diente MBP (engl.: „myelin basic protein“), das mit und ohne α -HA-Beads in die Reaktion gegeben wurde, um festzustellen, ob die Anwesenheit der Beads die Kinase-Reaktion stört. Als Negativkontrolle wurde die Immunpräzipitation auch mit dem Lysat nicht-transfizierter Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass MBP sehr stark durch die Proteinkinase C phosphoryliert wurde, wobei die Anwesenheit der Beads keinen Einfluss auf die Reaktion hatte (Abb. 3.26).

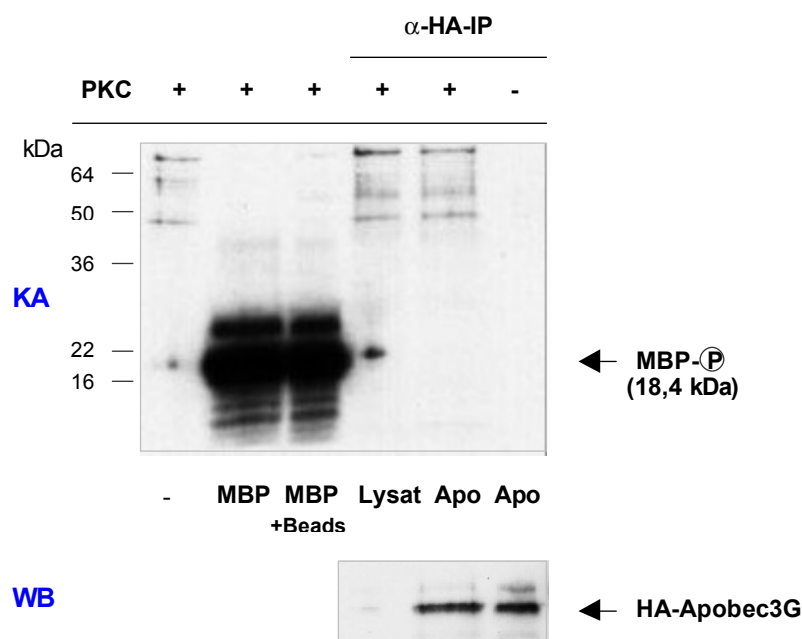


Abbildung 3.26 : Untersuchung einer Phosphorylierung von Apobec3G durch die Proteinkinase C. 2 Tage nach Transfektion von 2 μ g pcDNA3.1-HA-CEM15 in 293T-Zellen, wurde Apobec3G durch α -HA-Immunpräzipitation aufgereinigt (Apo). Die IP wurde auch mit nicht-transfizierten Zellen durchgeführt (Lysat). In einem Kinase-Assay (KA) wurde Apobec3G mit PKC inkubiert. Als Positivkontrolle dienten 5 μ g des PKC-Substrats MBP. Das immunpräzipitierte Apobec3G wurde anschließend im α -HA-Western Blot nachgewiesen (WB).

Apobec3G wurde dagegen nicht phosphoryliert, obwohl der Kontroll-Western Blot zeigte, dass das Protein nach der Immunpräzipitation in der Reaktion vorhanden gewesen war. Damit beruht die beobachtete Wirkung von TPA nicht auf einer direkten Phosphorylierung von Apobec3G durch die Proteinkinase C.

3.2.3. Rolle der MAP-Kinase ERK bei der TPA-induzierten Apobec3G-Expression

Um festzustellen, ob die Raf/MEK/ERK-Signalkaskade, die durch die PKC aktiviert wird, eine Rolle bei der durch TPA verstärkten Apobec3G-Expression spielt, wurde ein spezifischer Inhibitor dieses Signalwegs eingesetzt. 293T-Zellen wurden mit pcDNA3.1-HA-CEM15 und NL4-3-luc bzw. NL4-3-luc Δ vif kotransfiziert. 15 h vor der Zellyse und 30 min. vor Beginn der TPA-Stimulation wurde der MEK-Inhibitor U0126 zugegeben. Anschließend wurde ein α -HA-Western Blot durchgeführt. Abbildung 3.27 zeigt, dass TPA nach Inhibition des Raf/MEK/ERK-Signalwegs nicht mehr in der Lage war, die Apobec3G-Expression zu verstärken. Der Western Blot zeigt ebenfalls, dass wie bereits publiziert, der Vif-induzierte

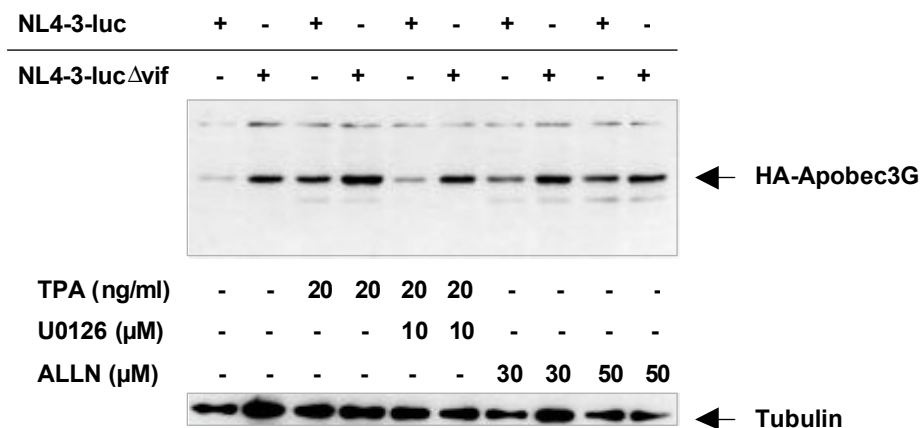


Abbildung 3.27 : Einfluss des MEK-Inhibitors U0126 auf die TPA-induzierte Apobec3G-Expression. 293T-Zellen wurden mit 2 μ g pcDNA3.1-HA-CEM15 und 2 μ g NL4-3-luc bzw. NL4-3-luc Δ vif kotransfiziert. 15 h vor der Zellyse wurden 10 μ M U0126 bzw. 30-50 μ M ALLN zugegeben. 30 min. später erfolgte die Stimulation mit 20 ng/ml TPA. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen für einen α -HA-Western Blot lysiert. Als Beladungskontrolle wurde ein α -Tubulin-Western Blot durchgeführt.

Apobec3G-Abbau durch den Proteasom-Inhibitor ALLN dosisabhängig gehemmt wurde (Marin et al. 2003). Der Raf/MEK/ERK-Signalweg ist also für die beobachtete Wirkung von TPA auf die Apobec3G-Expression notwendig. Daher wurde als nächstes untersucht, ob Apobec3G durch ERK phosphoryliert werden kann. HA-markiertes Apobec3G wurden in 293T-Zellen exprimiert und durch Immunpräzipitation aufgereinigt. ERK wurde aus TPA-stimulierten oder unstimulierten A3.01-Zellen immunpräzipitiert. Anschließend wurde eine mögliche Phosphorylierung von Apobec3G durch ERK im Kinase-Assay analysiert. Wie Abbildung 3.28 zeigt, war die aus TPA-stimulierten Zellen isolierte aktive Kinase in der Lage, ihr spezifisches Kontrollsubstrat Elk-1 zu phosphorylieren. Dagegen wurde keine Phosphorylierung von Apobec3G beobachtet, obwohl die erfolgreiche Immunpräzipitation des Proteins im Western Blot nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.28). Diese Experimente

zeigen, dass die Aktivität der MAP-Kinase ERK für die Aktivierung der Apobec3G-Expression durch TPA zwar notwendig ist, es jedoch nicht zu einer direkten Phosphorylierung von Apobec3G durch ERK kommt.

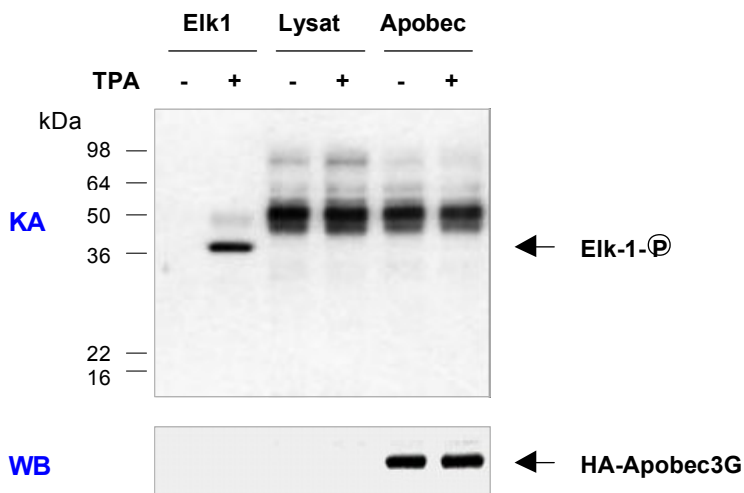


Abbildung 3.28 : Untersuchung einer Phosphorylierung von Apobec3G durch ERK. ERK1/2 wurde aus unstimulierten oder für 15 min. mit 100 ng/ml TPA stimulierten A3.01-Zellen immunpräzipitiert. HA-Apobec3G wurde in 293T-Zellen exprimiert, mittels α -HA-Immunpräzipitation isoliert und als Substrat im Kinase-Assay (KA) eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde eine α -HA-IP mit untransfizierten Zellen durchgeführt (Lysat). Als Positivkontrolle diente die Phosphorylierung von Elk-1. Apobec3G wurde anschließend im α -HA-Western Blot nachgewiesen (WB).

3.2.4. Untersuchung einer möglichen Phosphorylierung von Apobec3G

Die vorigen Experimente zeigten, dass Apobec3G weder von der Proteinkinase C, noch von ERK phosphoryliert wird. Um zu untersuchen, ob es sich bei Apobec3G um ein Phosphoprotein handelt und ob TPA-Stimulation oder die Anwesenheit von Vif einen Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus von Apobec3G haben, wurde eine *in-vivo*-Markierung mit ^{33}P -Orthophosphat durchgeführt. 293T-Zellen wurden mit pcDNA3.1-CEM15 alleine oder zusammen mit NL4-3-luc transfiziert. Als Positivkontrolle dienten mit pBS-kRSPA-HA-Tat_{SIVagm3} transfizierte Zellen, da wie in Kapitel 3.1.9.1. gezeigt, SIVagm3-Tat durch eine assoziierte Kinase phosphoryliert wird. Die radioaktive Markierung wurde mit unstimulierten und TPA-stimulierten Zellen durchgeführt. Apobec3G bzw. SIVagm3-Tat wurden dann durch α -HA-Immunpräzipitation von den übrigen Proteinen des Zellextrakts gereinigt und mittels SPD-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurden die ^{33}P -markierten Proteine durch Autoradiografie nachgewiesen. Abbildung 3.29 zeigt, dass SIVagm3-Tat wie erwartet als Phosphoprotein in der Zelle vorliegt. Apobec3G dagegen ist nicht phosphoryliert, und auch durch TPA-Stimulation oder Koexpression von HIV-1-Proteinen wird keine Phosphorylierung induziert. Dieses Experiment zeigt, dass es sich bei Apobec3G nicht um ein Phosphoprotein handelt.

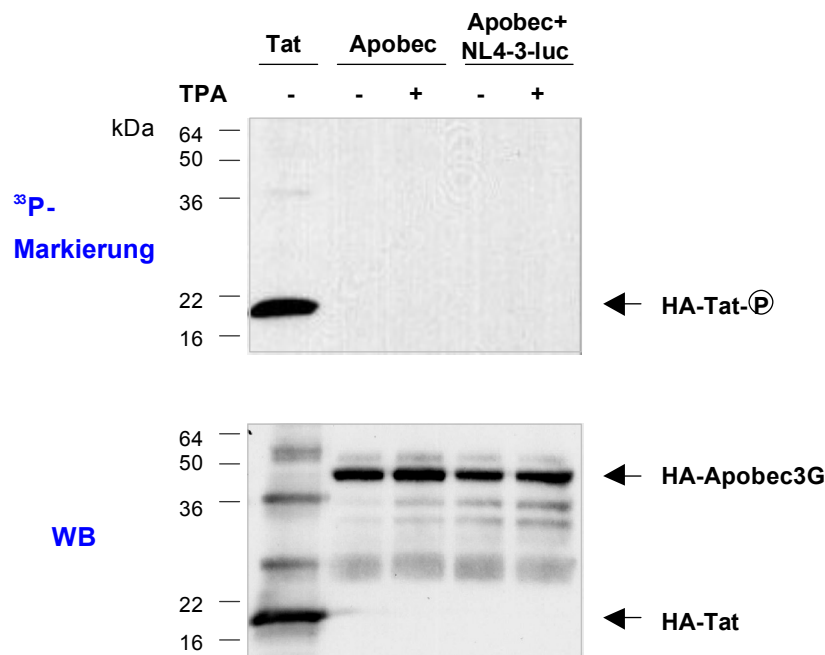


Abbildung 3.29 : Untersuchung einer möglichen Phosphorylierung von Apobec3G. Für eine radioaktive *in-vivo* Markierung wurden 293T-Zellen mit 2,6 µg pcDNA3.1-CEM15 allein oder zusammen mit 2,6 µg NL4-3-luc transfiziert. Als Positivkontrolle wurden 2,6 µg pBS-kRSPA-HA-Tat_{SIVagm3} transfiziert. Nach 2 Tagen erfolgte eine radioaktive Markierung mit ³³P, wobei die Hälfte der Ansätze für 1 h mit 100 ng/ml TPA stimuliert wurden. Nach einer α-HA-Immunpräzipitation erfolgte die Auftrennung im 14% SDS-Gel und die phosphorylierten Proteine wurden durch Autoradiografie detektiert (³³P-Markierung). Die immunpräzipitierten Proteine wurden anschließend im α-HA-Western Blot nachgewiesen (WB).

3.2.5. Koimmunpräzipitation von Vif und Apobec3G

Vif neutralisiert den zellulären, antiviralen Faktor Apobec3G, indem es die Ubiquitinierung und damit die Degradation von Apobec3G im Proteasom induziert. Der molekulare Mechanismus dieser Vorgänge ist noch nicht aufgeklärt, aber es ist anzunehmen, dass Vif dazu mit Apobec3G interagieren muss. Um eine Assoziation der beiden Proteine

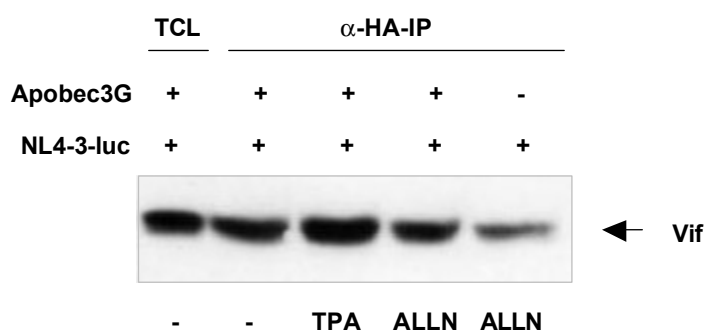


Abbildung 3.30 : Assoziation von Vif und Apobec3G. 293T-Zellen wurden mit 2 µg pcDNA3.1-HA-CEM15 und 2 µg NL4-3-luc kotransfiziert. Als Negativkontrolle dienten nur mit NL4-3-luc transfizierte Zellen. Einige Ansätze wurden 15 h vor der Zellyse mit 20 ng/ml TPA oder 50 µM ALLN behandelt. 2 Tage nach Transfektion wurde eine α-HA-Immunpräzipitation (IP) und anschließend ein α-Vif-Western Blot durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde Vif im Totalzelllysate nachgewiesen (TCL).

experimentell nachzuweisen, wurden HA-Apobec3G und Vif in 293T-Zellen koexprimiert. Einige Ansätze wurden für 15 h mit TPA oder dem Proteasom-inhibitor ALLN behandelt, um

die Apobec3G-Menge im Zelllysate zu erhöhen. Nach 2 Tagen wurde Apobec3G durch α -HA-Immunpräzipitation isoliert und ein α -Vif-Western Blot durchgeführt (Abb. 3.30). Als Positivkontrolle wurde Vif im Totalzelllysate nachgewiesen. Vif konnte in allen Ansätzen detektiert werden, allerdings auch dann, wenn kein Apobec3G im Lysate vorhanden war. Dies lässt sich vermutlich damit erklären, dass Vif sehr stark exprimiert wurde, so dass es trotz Waschen der Beads nicht vollständig aus der Probe entfernt wurde. Da allerdings die Vif-Bande in Abwesenheit von Apobec3G deutlich schwächer war, als in Anwesenheit von Apobec3G, deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass beide Proteine assoziiert sind.

3.2.6. Einfluss von Vif auf den Einbau von Apobec3G in die Viruspartikel

Mariani et al. (2003) zeigten, dass Vif die Apobec3G-Konzentration im Zytosol um den Faktor 3 reduziert, im Viruspartikel aber nahezu kein Apobec3G mehr detektiert werden kann. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass es neben dem Abbau von Apobec3G noch einen weiteren Mechanismus gibt, der die Inkorporation von Apobec3G in die Viruspartikel verhindert. Dies lässt sich sehr gut in TPA-stimulierten Zellen untersuchen, da hier trotz der Gegenwart von Vif große Mengen Apobec3G in den Zellen vorhanden sind. 293T-Zellen

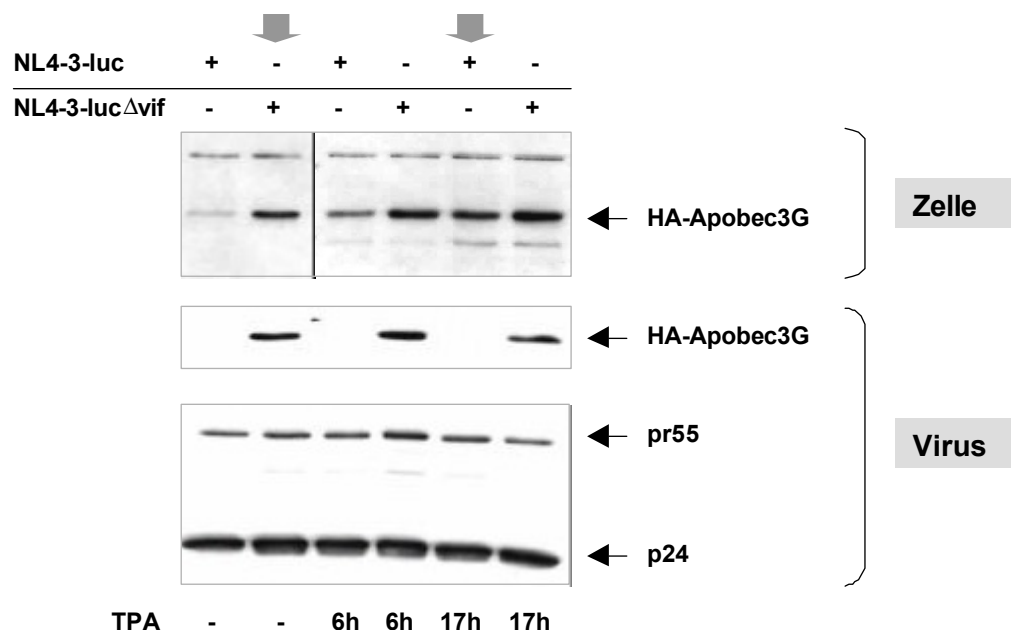


Abbildung 3.31 : Einfluss von Vif auf die Inkorporation von Apobec3G in die Viruspartikel. 293T-Zellen wurden mit 2 μ g pcDNA3.1-HA-CEM15 und 2 μ g NL4-3-luc bzw. NL4-3-luc Δ vif kotransfiziert. 6 h bzw. 17 h vor der Lyse erfolgte die Stimulation mit 20 ng/ml TPA. 2 Tage nach Transfektion wurden die Viruspartikel aus den Überständen durch Ultrazentrifugation angereichert und lysiert. Virus- und Zelllysate wurden im α -HA-Western Blot auf die Apobec3G-Expression untersucht. Zum Nachweis gleicher Virusmengen wurde anschließend ein α -p24-Western Blot durchgeführt.

wurden mit pcDNA3.1-HA-CEM15 und NL4-3-luc bzw. NL4-3-luc Δ vif kotransfiziert. Nach 2 Tagen wurden von den unstimulierten oder TPA-stimulierten Zellen zur Virusgewinnung Überstände abgenommen. Viren und Zellen wurden lysiert und ein α -HA-Western Blot durchgeführt. Als Beladungskontrolle für die Viruslysate wurde anschließend ein Western Blot mit einem Antikörper gegen das Viruskapsid-Protein p24 durchgeführt, der auch das Vorläuferprotein pr55 erkennt. Wie in Abbildung 3.31 zu erkennen ist, steigt die Apobec3G-Proteinmenge nach 6 h TPA-Stimulation an und nach 17 h kann sowohl in Vif-exprimierenden, als auch in Δ Vif-Zellen eine verstärkte Apobec3G-Expression beobachtet werden. Vergleicht man nun die Apobec3G-Banden in unstimulierten Zellen ohne Vif bzw. in TPA-stimulierten Zellen mit Vif (Spuren 2 und 5, durch Pfeile gekennzeichnet), so findet man vergleichbare Mengen von Apobec3G im Zelllysät, in Gegenwart von Vif aber kein Apobec3G im Viruspartikel.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass Vif mehrere Strategien anwendet, um zu verhindern, dass der antivirale Faktor Apobec3G die Infektiosität der entstehenden Viruspartikel herabsetzt. Zum einen wird die Degradation des Proteins im Proteasom vermittelt, zusätzlich inhibiert Vif den Einbau des verbliebenen Apobec3G in die Viruspartikel.

3.2.7. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ergebnisse des zweiten Teils dieser Arbeit zeigen, dass die Expression von Apobec3G durch die mitogene Raf/MEK/ERK-Signalkaskade reguliert wird. Eine Aktivierung dieses Signalwegs durch den Phorbolster TPA führt zu einer verstärkten Apobec3G-Expression, die durch Inhibition der Aktivität der Proteinkinase C oder der MAPK ERK blockiert werden kann. Dabei ist die verstärkte Apobec3G-Expression nicht auf eine Phosphorylierung durch diese Kinasen zurückzuführen, vielmehr handelt es sich bei Apobec3G nicht um ein Phosphoprotein.

Die Untersuchung der Apobec3G/Vif-Interaktionen zeigte eine Assoziation der beiden Proteine. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass Vif die antivirale Funktion von Apobec3G nicht ausschließlich durch Induktion der Degradation des Proteins verhindert, sondern dass Vif zudem die Inkorporation des vorhandenen Apobec3G in die Viruspartikel inhibiert.

4. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurden bestimmte Aspekte der Virus/Wirtszellinteraktion untersucht, die eine Rolle bei der Replikation von HIV und SIV spielen. Im ersten Teil der Arbeit wurde die Induktion des Zytokins Interleukin-2 (IL-2) durch das simiane Immundefizienzvirus SIVagm3 untersucht. Dieser T-Zell-Wachstumsfaktor spielt eine noch ungeklärte Rolle bei der Dysregulation des Immunsystems durch pathogene Immundefizienzviren. Neuere Studien zeigen, dass Immundefizienzviren die Interleukin-2-Expression beeinflussen können, allerdings sind diese Vorgänge auf molekularer Ebene noch weitgehend unerforscht. In der vorliegenden Arbeit wurden daher die molekularen Mechanismen der IL-2-Induktion durch SIVagm3 analysiert.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die Interaktionen intrazellulärer Signalkaskaden mit dem antiviralen Faktor Apobec3G untersucht. Apobec3G wurde erst kürzlich als zellulärer Gegenspieler des viralen Vif-Proteins identifiziert und seine antivirale Funktion, die in der Deaminierung der viralen Minusstrang-DNA während der reversen Transkription besteht, wurde bereits weitgehend aufgeklärt. Da über die Regulation von Apobec3G bislang noch wenig bekannt ist, wurde der Einfluss der Zellaktivität auf die Apobec3G-Expression untersucht.

4.1. Interleukin-2-Induktion durch SIVagm3

Eine Infektion mit Immundefizienzviren führt zu Veränderungen der normalen Immunfunktionen des Organismus. Noch ist unklar, weshalb natürlich infizierte Primaten nicht erkranken, während HIV im Menschen zu einer letalen Abnahme der CD4-T-Zellzahl führt, aber es ist möglich, dass Interleukin-2 als wichtiger T-Zell-Wachstumsfaktor dabei eine Rolle spielt. Im Falle von HIV-1 wurde die Induktion von Interleukin-2 bereits *in vivo* und *in vitro* beschrieben. In HIV-1-infizierten Patienten konnten erhöhte IL-2-Konzentrationen vor allem in den Lymphknoten festgestellt werden, während im peripheren Blut keine Veränderung beobachtet wurde (Graziosi et al. 1996). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass T-Zellen durch eine Infektion mit HIV-1 immunhyperaktiviert wurden und nach α -CD3/ α -CD28-Stimulation verstärkt IL-2 ausschütteten (Ott et al. 1997, Wu et al. 2001). Es wird angenommen, dass HIV dadurch seine Replikation in ruhenden, nicht-aktivierten T-Zellen ermöglicht, welche die Hauptzielzellen des Virus darstellen. Der Eintritt des Virus in diese Zellen ist möglich, aber eine Integration kann nur sehr ineffizient erfolgen. Wu et al. (2001) konnten zeigen, dass Nef und Tat bereits vor der Integration in das Wirtsgenom exprimiert

werden und auf noch unbekannte Weise die Aktivität der T-Zellen und damit die IL-2-Synthese erhöhen.

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass eine Infektion mit dem apathogenen simianen Immundefizienzvirus der Afrikanischen Grünen Meerkatze (Genus *Chlorocebus*) SIVagm3 in humanen PBMC ebenfalls die Sekretion von IL-2 hervorrufen kann. Dabei wurde eine suboptimale α -CD3/ α -CD28-Stimulation durchgeführt, durch die der Aktivierungsstatus der T-Lymphozyten unterhalb des Schwellenwertes für die T-Zellaktivierung blieb. Bereits zwei Tage nach der Infektion wurde eine maximale Ausschüttung von Interleukin-2 gemessen, während die Virusproduktion an Tag 4 ihren Höhepunkt erreichte. Diese Beobachtung lässt sich mit der oben beschriebenen Annahme von Wu et al. (2001) erklären, dass die Interleukin-2-Sekretion zu einer Aktivierung der T-Zellen führte und damit erst die Virusreplikation in den suboptimal stimulierten T-Zellen ermöglichte.

Um die IL-2-Induktion auf Transkriptionsebene zu untersuchen, wurde ein Reporterkonstrukt verwendet, in welchem die Transkription des Reportergens durch den Interleukin-2-Promotor kontrolliert wird. Dabei wurde der humane IL-2-Promotor gewählt, da die Sequenz des IL-2-Promotors der Afrikanischen Grünen Meerkatze bisher unbekannt ist. Man kann aber davon ausgehen, dass sich beide Sequenzen nicht wesentlich unterscheiden, da bereits der Sequenzvergleich mit dem murinen IL-2-Promotor 84 % Homologie aufweist und die wichtigen Transkriptionsfaktorbindungsstellen auf beiden Promotoren zu finden sind. Die Untersuchung der IL-2-Promotor-abhängigen Transkription in der T-Zelllinie A3.01 zeigte nach Transfektion von SIVagm3 eine bis zu 38-fach erhöhte transkriptionelle Aktivität des IL-2-Promotors, die auch zu der Synthese von IL-2-mRNA führte. Interessanterweise induzierte HIV-1 nur eine 10-fache Aktivität des IL-2-Promotors im Vergleich zur basalen Aktivität des Reporterplasmids. Die Beobachtung, dass das apathogene SIVagm3 eine stärkere IL-2-Induktion hervorruft, als HIV-1, könnte ein Hinweis darauf sein, dass die IL-2-Produktion möglicherweise protektiv wirkt und natürlich infizierte Primaten vor einem kritischen Abfall der Zahl der CD4-positiven T-Zellen schützt. Auch in der HIV-Therapie wird Interleukin-2 eingesetzt. Klinische Studien zeigen, dass die Verabreichung von Interleukin-2 in Kombination mit HAART (engl.: „highly active antiretroviral therapy“) die Zahl der CD4-positiven T-Lymphozyten erhöht, indem die Lebensdauer dieser Zellen verlängert wird (Stellbrink et al. 2002, Levy et al. 2003). Allerdings konnte bisher nicht gezeigt werden, dass dieser Effekt letztlich auch zu einer verminderten Viruslast bzw. zu einem Herausögern der AIDS-Progression führt (Paredes et al. 2002). Dies wird in einer aktuellen klinischen Studie der Phase III untersucht (Emery et al. 2002).

Gegen eine protektive Funktion von Interleukin-2 in der natürlichen SIV-Infektion spricht die Tatsache, dass man heute davon ausgeht, dass gerade die durch HIV verursachte Immunhyperaktivierung schließlich zu dem Zusammenbruch des Immunsystems führt (Silvestri et al. 2003).

Um die komplexe Rolle von Interleukin-2 in der HIV/SIV-Infektion aufzuklären, sind weiterführende Studien notwendig. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich in erster Linie mit den molekularen Ereignissen, die zur Interleukin-2-Induktion durch SIVagm3 führen, um mechanistische Erkenntnisse über die virusinduzierte Immundysregulation zu gewinnen.

4.2. Molekulare Mechanismen der IL-2-Induktion durch SIVagm3

Die transkriptionelle Aktivierung des induzierbaren Interleukin-2-Promotors erfordert die Kooperation mehrerer Signalwege, die über den TCR/CD3-Komplex und einen Korezeptor wie CD28 vermittelt werden und zu der Aktivierung essentieller Transkriptionsfaktoren beitragen. Dabei kommt es zur Aktivierung der MAPK-Signalkaskaden, des Calcineurin/NF-AT-Signalwegs und des NF- κ B-Signalwegs. Insbesondere die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-AT in aktivierten T-Zellen durch die Ca^{2+} -abhängige Phosphatase Calcineurin wird als essentiell für die IL-2-Induktion angesehen. Substanzen wie Cyclosporin A oder FK506, die die Calcineurin-Aktivität inhibieren, werden klinisch als Immunsuppressiva eingesetzt, da sie die IL-2-Synthese hemmen (Jorgensen et al. 2003). *In vitro* können T-Zellen auch durch kombinierte Behandlung mit dem PKC-Aktivator TPA und dem Ca^{2+} -Ionophor Ionomycin aktiviert werden. Dieser Stimulus führt über Aktivierung der oben genannten Signalwege zur IL-2-Induktion, die durch MAPK-Inhibitoren oder Calcineurin-Inhibitoren blockiert werden kann (Hoffmeyer et al. 1998).

Die Mechanismen, über die Immundefizienzviren die Expression des IL-2-Gens induzieren können, sind bisher wenig untersucht worden. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die MAP-Kinasen ERK, JNK/SAPK und p38 an der SIVagm3-induzierten IL-2-Expression beteiligt sind. Da diese Kinasen in unstimulierten T-Zellen nicht aktiv sind, lässt sich vermuten, dass SIVagm3 eine Aktivierung der MAP-Kinasen hervorruft. Die Aktivierung von MAP-Kinasen durch HIV oder SIV wurde bereits mehrfach beschrieben. So wurde gezeigt, dass durch Bindung der Hüllproteine von HIV und SIV an CD4 und die Korezeptoren die ERK-, JNK/SAPK- und p38-Signalkaskaden aktiviert werden (Popik et al. 2000, Cicala et al. 2002). Auch durch die viralen Proteine Nef und Tat können ERK und JNK/SAPK aktiviert werden (Schrager et al. 2002, Mischianti et al. 1999). Im Falle von SIVagm3 scheint eine Aktivierung von MAPK durch regulatorische Virusproteine wahrscheinlicher, da hier mit der Transfektion des Volllängengenoms der rezeptorvermittelte Eintrittsprozess des viralen Replikationszyklus umgangen wurde und bereits 30 h nach Transfektion hohe Luciferase-Konzentrationen

gemessen werden konnten, also bevor nennenswerte Mengen neuer Viruspartikel gebildet werden konnten.

Die Untersuchung des Calcineurin/NF-AT-Signalwegs zeigte überraschenderweise, dass dieser nicht an der IL-2-Aktivierung durch SIVagm3 beteiligt war. Inhibition von Calcineurin inhibierte zwar die TPA/Ionomycin-induzierte IL-2-Expression, hatte aber keinen Einfluss auf die IL-2-Induktion durch SIVagm3. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung wurde die NF-AT-abhängige Transkription durch SIVagm3 nicht aktiviert, obwohl Behandlung mit TPA und Ionomycin zu einer starken transkriptionellen Aktivierung des NF-AT-responsiven DNA-Elements führte. Damit wurde zum ersten Mal ein NF-AT-unabhängiger Weg der IL-2-Induktion gezeigt. Zwar findet man in der Literatur Beispiele für Cyclosporin-resistente Mechanismen der IL-2-Induktion, doch diese beruhen auf einer Calcineurin-unabhängigen NF-AT-Aktivierung (Ghosh et al. 1996, Murphy et al. 2002).

Der dritte wichtige Signalweg bei der IL-2-Induktion in aktivierten T-Zellen führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Eine erhöhte transkriptionelle Aktivierung des NF- κ B-responsiven DNA-Elements konnte auch durch SIVagm3 beobachtet werden. Damit zeigen die durchgeführten Studien, dass SIVagm3 einen alternativen, bisher nicht beschriebenen Mechanismus der IL-2-Induktion anwendet. Während in CD3/CD28-stimulierten T-Zellen MAP-Kinasen, Calcineurin/NF-AT und der NF- κ B-Signalweg zur IL-2-Genexpression beitragen, erfolgt die SIVagm3-induzierte IL-2-Expression ebenfalls über MAP-Kinasen und NF- κ B, aber unabhängig von Calcineurin und NF-AT.

4.3. Tat als Phosphoprotein und seine Rolle bei der IL-2-Induktion

Um die Funktion des Tat-Proteins bei der IL-2-Induktion zu untersuchen, wurden Expressionsplasmide für SIVagm3-Tat, HIV-1(NL4-3)-Tat und HIV-2(BEN)-Tat konstruiert. Es konnte gezeigt werden, dass SIVagm3-Tat an der IL-2-Induktion beteiligt ist, indem es das CD28/AP-1-responsive Element des IL-2-Promotors aktiviert. Dieser Befund bestätigt die von Ott et al. (1997) publizierte Beobachtung, dass im Falle von HIV-1 eine erhöhte IL-2-Expression über Tat und das CD28-responsive Element vermittelt wird. Um die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Unterschiede in der Interleukin-2-Induktion durch SIVagm3 und HIV-1(NL4-3) zu erklären, wurde der Einfluss der Tat-Proteine verglichen. Beide Proteine hatten einen ähnlichen Effekt auf die transkriptionelle Aktivierung des Interleukin-2-Promotors. Dagegen konnte gezeigt werden, dass die basale Aktivität der SIVagm3-LTR in der T-Zelllinie A3.01 und in humanen PBL wesentlich höher war, als die der HIV-1(NL4-3)-LTR. Es ist daher möglich, dass die stärkere IL-2-Induktion durch SIVagm3 auf einer stärkeren Expression der dafür verantwortlichen Gene, wie zum Beispiel Tat beruht.

Darüberhinaus wurde beobachtet, dass SIVagm3-Tat nur in TPA/Ionomycin-stimulierten A3.01-Zellen in der Lage war, die Interleukin-2-Expression zu verstärken, während die Transfektion des Vollängengenoms von SIVagm3 die beobachtete transkriptionelle Aktivierung in unstimulierten Zellen induzierte. Dies lässt darauf schließen, dass Tat zwar zur IL-2-Induktion beiträgt, aber nicht alleine für diesen Effekt verantwortlich ist. Es ist denkbar, dass ein weiteres virales Protein beteiligt ist, das die Aktivierung der MAP-Kinasen hervorruft.

Eine mögliche Erklärung für die Rolle der MAP-Kinasen wäre die Regulation der Aktivität des Tat-Proteins durch Phosphorylierung. Diese Möglichkeit wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht. Die Aminosäuresequenz von SIVagm3-Tat enthält zwar das minimale Konsensusmotiv (S/T)P für MAP-Kinasen nicht, doch es sind MAPK-Substrate bekannt, die unabhängig von diesem Motiv phosphoryliert werden. Ein Beispiel stellt das Vif-Protein von HIV-1 dar (Yang et al. 1998). Die Experimente mit SIVagm3-Tat zeigten keine Phosphorylierung durch die MAP-Kinasen ERK2, JNK1/SAPK oder p38. Auch die ebenfalls untersuchten Tat-Proteine von HIV-1(NL4-3) und HIV-2(BEN) wurden durch ERK2, JNK1/SAPK und p38 nicht phosphoryliert, obwohl HIV-2(BEN)-Tat das typische (S/T)P-Motiv mehrfach enthält. Diese Daten stehen im Gegensatz zu einer Publikation, die eine Phosphorylierung von HIV-1-Tat durch ERK zeigt (Yang et al. 1999). Dabei handelte es sich um die bisher einzige Veröffentlichung, die eine Phosphorylierung von Tat durch ERK beschreibt. Die Ursache dieser gegensätzlichen Resultate ist unklar, aber in dieser Publikation wurde bakteriell exprimiertes HIV-1-Tat verwendet, das möglicherweise nicht in seiner authentischen Struktur vorliegt.

Dagegen wurde in der vorliegenden Arbeit eine starke Phosphorylierung von SIVagm3-Tat durch Kinasen beobachtet, die mit Tat koimmunpräzipitierten und selbst durch stringente Waschbedingungen mit Salzkonzentrationen von bis zu 750 mM NaCl nicht abgelöst werden konnten. Dass es sich bei einer dieser Kinasen um die Cyclin-abhängige Proteinkinase 9 (CDK9) handelt, konnte nachgewiesen werden, indem bakteriell exprimiertes SIVagm3-Tat, an das die zelluläre Kinase nicht gebunden ist, *in vitro* durch CDK9 phosphoryliert wurde. Zudem konnte die Assoziation von CDK9 mit dem aus 293T-Zellen immunpräzipitierten Tat gezeigt werden. In der Literatur wurde bereits die Phosphorylierung von HIV-2-Tat durch CDK9 beschrieben. Yang et al. (1996) konnten zeigen, dass CDK9 mit HIV-1-Tat und HIV-2-Tat assoziiert ist, aber nur HIV-2-Tat phosphoryliert. Die beobachtete MAPK-unabhängige Phosphorylierung von HIV-2(BEN)-Tat lässt sich daher mit hoher Wahrscheinlichkeit ebenfalls auf CDK9 zurückführen. Die Analyse der Phosphorylierung von SIVagm3-Tat in verschiedenen Zelllinien zeigte eine Phosphorylierung in humanen und simianen Nierenzelllinien, aber nur eine sehr schwache Bande in der murinen Fibroblastenzelllinie

NIH3T3. Dies lässt sich damit erklären, dass das murine Cyclin T1, das die Bindung zwischen CDK9 und Tat vermittelt, an Position 261 anstelle eines Cysteins ein Tyrosin besitzt (Bieniasz et al. 1998). Aufgrund dieses Unterschieds kann der CDK9/Cyclin T1-Komplex in murinen Zellen nicht an Tat binden. Da, wie in Kapitel 1.2.3. beschrieben, die Bindung des CDK9/Cyclin T1-Komplex an Tat für die Expression viraler Gene essentiell ist, trägt dies auch zur Erklärung bei, warum die Replikation humaner oder simianer Immundefizienzviren in Nagerzellen nicht möglich ist (Chen et al. 1999).

In der vorliegenden Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass es neben CDK9 weitere unbekannte Kinasen gibt, die mit SIVagm3-Tat koimmunpräzipitieren und das virale Protein phosphorylieren. Auch nach Depletion von CDK9 kam es weiterhin zu einer Phosphorylierung des Tat-Proteins. Dabei kann eine unvollständige Depletion der zellulären Kinase ausgeschlossen werden, da bereits in der dritten von vier Depletionsrunden kein CDK9 mehr im Western Blot detektiert wurde. Zudem konnte eine Autophosphorylierung der CDK9, die auch von Yang et al. (1996) beschrieben wird, nach der CDK9-Depletion nicht mehr beobachtet werden. Interessant war auch die Beobachtung, dass die Tat-Phosphorylierung nach der CDK9-Depletion nur geringfügig schwächer wurde, obwohl durch die Assoziation beider Proteine auch Tat aus dem Zelllysats hätte depletiert werden müssen. Dies lässt sich damit erklären, dass das überexprimierte Tat in einer sehr viel höheren Konzentration in der Zelle vorliegt als das endogene Enzym CDK9 und somit nur ein geringer Anteil des Tat-Proteins mit CDK9 aus dem Zelllysats entfernt wurde.

Die Identität der weiteren Tat-assoziierten Kinasen konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Nachdem die Funktion der CDK9 bei der LTR-Transaktivierung aufgeklärt worden war, fand man in den letzten Jahren jedoch zunehmend Hinweise, dass weitere CDKs bei der LTR-Transaktivierung eine Rolle spielen. So wurde gezeigt, dass die Cyclin-abhängige Proteinkinase 7 (CDK7), die durch Phosphorylierung der C-terminalen Domäne (CTD) der RNA Polymerase II die Initiation der Transkription einleitet, ebenfalls an HIV-1-Tat bindet (Cujec et al. 1997). Die biologische Funktion dieser Interaktion konnte bisher allerdings nicht aufgeklärt werden. In T-Zellen wurde ein sogenannter TKK-Komplex (engl.: „Tat-associated T-cell-derived kinase“) entdeckt, der mit dem HIV-1-Tat-Protein assoziiert ist (Nekhai et al. 1997). Dieser Proteinkomplex enthält neben anderen Proteinen die Cyclin-abhängige Proteinkinase 2 (CDK2). Es wurde gezeigt, dass CDK2 HIV-1-Tat und CDK7 phosphorylieren kann, aber nur dynamisch mit dem viralen Protein assoziiert ist (Deng et al. 2002, Nekhai et al. 2002). Vermutlich ist die Cyclin-abhängige Proteinkinase 2, die auch die CTD der RNA Polymerase II phosphoryliert, ebenfalls an der Tat-vermittelten Transkription beteiligt. Im Falle von SIVagm3 jedoch konnte auch durch Depletion von CDK9, CDK7 und CDK2 die Phosphorylierung von Tat nicht inhibiert werden, es müssen

daher noch eine oder mehrere weitere unbekannte Kinasen im Transkriptionskomplex vorhanden sein, die Tat phosphorylieren können.

Die Funktion der Phosphorylierung von HIV- oder SIV-Tat konnte bisher nicht aufgeklärt werden, aber Deng et al. (2002) stellen die Hypothese auf, dass die dynamische Bindung des Tat-Proteins an CDK2 durch Phosphorylierung reguliert wird. Nach diesem Modell würde der CDK2/Cyclin E-Komplex zunächst an Tat binden, wodurch er in räumliche Nähe zu der CTD der RNA Polymerase II gebracht würde. Dann käme es zu einer Phosphorylierung der CDK-Bindungsstelle auf dem Tat-Protein, wodurch die CDK2 sich ablösen würde. Da Cyclin E weiterhin an Tat gebunden bliebe, würde CDK2 zur CTD der Polymerase II geleitet und würde diese phosphorylieren.

Noch ist aber keine biologische Bedeutung der Tat-Phosphorylierung nachgewiesen worden. Da jedoch bei anderen viralen Proteinen, wie zum Beispiel HIV-1-Vif, die wichtige Funktion einer Phosphorylierung gezeigt werden konnte (Yang et al. 1998), ist anzunehmen, dass auch die Phosphorylierung von Tat eine bestimmte Rolle bei der Transaktivierung spielt.

4.4. Wechselwirkungen intrazellulärer Signalwege mit der Apobec3G-Expression

Das zelluläre Protein Apobec3G und seine Funktion wurde erst kürzlich entdeckt (Sheehy et al. 2002, Harris et al. 2003, Mangeat et al. 2003). Dieses Protein ist in der Lage, in HIV- oder SIV-infizierten Zellen die Entstehung infektiöser Viruspartikel zu verhindern, wenn seine Funktion nicht durch das virale Vif-Protein inhibiert wird. Die antivirale Wirkung von Apobec3G beruht auf seiner DNA-Deaminase-Aktivität, mit der das in die entstehenden Viruspartikel verpackte Protein die reverse Transkription in der neuen Wirtszelle stört. Über die Regulation von Apobec3G ist allerdings noch wenig bekannt. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die mitogene Zellaktivierung einen Einfluss auf die Apobec3G-Expression bzw. die Apobec3G-Degradation durch Vif hat.

Nach Aktivierung der mitogenen Raf/MEK/ERK-Signalkaskade durch den PKC-Aktivatoren TPA konnte eine erhöhte Apobec3G-Konzentration im Western Blot beobachtet werden, während die spezifische Inhibition von MEK zu einer verminderten Apobec3G-Expression führte. Für die Erhöhung der Apobec3G-Konzentration durch TPA kommen mehrere Mechanismen in Betracht: eine erhöhte Transkriptionsrate, eine verstärkte Proteinsynthese bei gleichbleibender Genexpression oder ein verminderter Abbau des Proteins. Die erste Möglichkeit ist auszuschließen, da die Transkription von Apobec3G in dem verwendeten Expressionsplasmid durch einen CMV-Promotor kontrolliert wird und in einem analogen Vif-Expressionssystem keine erhöhte Vif-Konzentration nach TPA-Stimulation gemessen wurde.

Ein Einfluss auf den proteolytischen Abbau von Apobec3G ist möglich, aber auch in TPA-stimulierten Zellen funktionierte weiterhin der Vif-induzierte Abbau von Apobec3G. Daher scheint eine verstärkte Proteinsynthese z. B. aufgrund einer erhöhten mRNA-Stabilität die wahrscheinlichste Erklärung zu sein.

Überraschenderweise hatte die Aktivierung oder Inhibition der mitogenen Signalkaskade keinen erkennbaren Einfluss auf die Vif-induzierte Apobec3G-Degradation. Zwar war der beobachtete Unterschied der Apobec3G-Konzentration in Vif-exprimierenden und Δvif -Zellen nicht mehr so stark ausgeprägt, aber dies lässt sich damit erklären, dass die Apobec3G-Menge durch die TPA-Stimulation stark angestiegen war, während die Vif-Konzentration konstant blieb. Bereits vor der Aufklärung der eigentlichen Funktion des Vif-Proteins wurde beschrieben, dass Vif durch ERK phosphoryliert wird und eine Mutation der entsprechenden Phosphorylierungsstellen die Replikationsfähigkeit des Virus hemmt (Yang et al. 1998). Da die Aufgabe des Vif-Proteins in der Neutralisierung von Apobec3G besteht, ist es erstaunlich, dass durch Inhibition der MEK-vermittelten ERK-Aktivierung die Fähigkeit des Vif-Proteins, den Abbau von Apobec3G im Proteasom zu induzieren nicht beeinflusst wird. Diese Funktion des Vif-Proteins scheint also unabhängig von der Phosphorylierung des viralen Proteins zu sein.

Der Phorbolester TPA führt, wie bereits beschrieben, zu einer Aktivierung der Proteinkinase C (Tan et al. 2003). Diese aktiviert die mitogene Raf/MEK/ERK-Signalkaskade, aber auch weitere zum Teil noch unbekannte Signalwege (Hogan et al. 2003). Wie erwartet wurde durch Zugabe der PKC-Inhibitoren Staurosporin und Gö6983 der Einfluss von TPA auf die Apobec3G-Expression gehemmt. Dabei zeigte der dritte eingesetzte PKC-Inhibitor Gö6976 keinen Effekt, was aber vermutlich auf die schlechte Löslichkeit dieses Inhibitors zurückzuführen ist. Weiter konnte gezeigt werden, dass die mitogene Signalkaskade für die durch TPA verstärkte Apobec3G-Expression verantwortlich ist. Die Inhibition dieses Signalwegs durch den spezifischen MEK-Inhibitor U0126 konnte die Wirkung von TPA aufheben.

Damit führt die TPA-Stimulation zu einer Aktivierung der Raf/MEK/ERK-Signalkaskade, die auf noch unbekannte Weise die Proteinmenge von Apobec3G in der Zelle erhöht. Die Vermutung, dass dieser Effekt mit einer Phosphorylierung von Apobec3G durch PKC oder ERK zusammenhängt, konnte aber nicht bestätigt werden, da *in-vitro*-Kinase-Assays keine Phosphorylierung von Apobec3G durch PKC oder ERK zeigten. Zudem konnte durch *in-vivo*-Versuche nachgewiesen werden, dass Apobec3G nicht als Phosphoprotein in der Zelle vorliegt. Auch durch TPA-Stimulation oder Expression von Vif änderte sich der unphosphorylierte Zustand des Proteins nicht.

Es konnte also gezeigt werden, dass TPA über die Aktivierung der MAP-Kinase ERK eine Erhöhung der Apobec3G-Konzentration hervorruft. Noch ist unklar, wie der molekulare Mechanismus aussieht, aber Apobec3G selbst wird nicht durch Phosphorylierung reguliert.

4.5. Vif/Apobec3G-Interaktionen

Obwohl inzwischen bekannt ist, dass die Funktion von Vif in der Neutralisierung der Wirkung des antiviralen Faktors Apobec3G besteht, ist der molekulare Mechanismus noch nicht vollständig aufgeklärt. Zum Teil beruht die Wirkung von Vif auf einer Degradation von Apobec3G. So konnte gezeigt werden, dass Vif die Ubiquitinierung des zellulären Proteins induziert, indem Vif mit den zellulären Proteinen Cullin-5, Elongin B, Elongin C und Rbx1 einen klassischen Ubiquitinierungskomplex bildet (Yu et al. 2003). Ob Vif dabei direkt mit Apobec3G assoziiert ist, war bisher unklar. In der vorliegenden Arbeit konnte eine Assoziation der beiden Proteine gefunden werden, indem nach einer Apobec3G-Immunpräzipitation Vif nachgewiesen wurde. Allerdings wurde auch in Kontrollzellen, die kein Apobec3G exprimierten, eine geringere Menge Vif detektiert. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass Vif sehr stark exprimiert wurde und selbst die geringen Mengen des Proteins, die nach dem Waschen noch in der Probe vorhanden waren, durch das Antiserum erkannt wurden. Zudem kann nicht ausgeschlossen werden, dass Vif schwach an die verwendeten beads bindet. Da allerdings die detektierte Vif-Bande in Abwesenheit von Apobec3G deutlich schwächer war, kann man davon ausgehen, dass tatsächlich eine Assoziation von Vif und Apobec3G vorliegt. Dies konnte inzwischen auch von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden (Yu et al. 2003, Mehle et al. 2004).

Die Degradation von Apobec3G alleine kann jedoch den Ausschluss der DNA-Deaminase aus den entstehenden Viruspartikeln nicht erklären. Durch den Abbau des Proteins wird die Apobec3G-Konzentration in der Zelle nur um den Faktor 3 reduziert, im Viruspartikel dagegen wurde eine Reduktion um den Faktor 140 gezeigt (Mariani et al. 2003). In diesem Zusammenhang scheint eine Publikation von Yu et al. (2003), die beschreibt, dass bei Blockieren der Vif-induzierten Apobec3G-Degradation durch Proteasominhibitoren wieder gleiche Mengen von Apobec3G im Viruspartikel zu finden sind, wie in Abwesenheit von Vif, etwas zweifelhaft. So konnte in der vorliegenden Arbeit auch gezeigt werden, dass Vif nicht nur den Abbau von Apobec3G induziert, sondern auch die Inkorporation des vorhandenen Proteins in die Viruspartikel verhindert. Dies konnte sehr gut in TPA-stimulierten Zellen untersucht werden, da hier, wie in Kapitel 4.4. beschrieben, trotz der Gegenwart von Vif deutliche Mengen an Apobec3G vorhanden waren. So konnte bei vergleichbaren Apobec3G-Konzentrationen im Zelllysate gezeigt werden, dass Vif den Einbau des Proteins in die

Viruspartikel inhibiert. Der molekulare Mechanismus hierfür ist allerdings noch völlig unklar, und zukünftige Studien müssen zeigen, wie die verschiedenen Strategien des Vif-Proteins auf molekularer Ebene funktionieren. Interessant wäre es in diesem Zusammenhang die Rolle der Vif-Phosphorylierung zu untersuchen. Wie bereits erwähnt, beschreiben frühere Publikationen, dass die ERK-Phosphorylierung für die Aktivität des Vif-Proteins notwendig ist (Yang et al. 1998). Da in der vorliegenden Arbeit aber kein Einfluss von ERK auf die den ubiquitinvermittelten Abbau von Apobec3G festgestellt werden konnte, spielt diese Phosphorylierung möglicherweise bei der Inhibition der Apobec3G-Inkorporation in die Viruspartikel eine Rolle. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass der Einbau von Apobec3G über eine direkte Interaktion mit dem viralen Gag-Protein erfolgt (Alce et al. 2004). Weitere Studien werden Aufschluss darüber geben, ob Vif möglicherweise diese Interaktion verhindert und ob eine Phosphorylierung dabei eine Rolle spielt.

5. ZUSAMMENFASSUNG

5.1. Induktion der Interleukin-2-Expression durch das simiane Immundefizienzvirus SIVagm3

Der T-Zell-Wachstumsfaktor Interleukin-2 (IL-2) wird von Antigen-stimulierten T-Zellen sezerniert und spielt eine wichtige Rolle bei der zellulären Immunantwort. Dabei tragen in aktivierten T-Zellen die MAPK-Signalwege, der Calcineurin/NF-AT-Signalweg und der NF- κ B-Signalweg kooperativ zur IL-2-Induktion bei. In den letzten Jahren wurden mehrere Hinweise gefunden, dass IL-2 möglicherweise bei der HIV- und SIV-Pathogenese eine Rolle spielt. Zwei Publikationen konnten bereits eine verstärkte IL-2-Sekretion HIV-1-infizierter T-Zellen nachweisen, die molekularen Mechanismen dieser IL-2-Induktion sind bisher allerdings kaum untersucht.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das apathogene simiane Immundefizienzvirus der Afrikanischen Grünen Meerkatze (SIVagm3) in suboptimal stimulierten PBMC ebenfalls die Interleukin-2-Sekretion verstärken kann. In der humanen T-Zelllinie A3.01 wurde nach Transfektion des Volllängenplasmids des SIVagm3 eine bis zu 38-fach verstärkte transkriptionelle Aktivierung des IL-2-Promotors beobachtet. Die Untersuchung der beteiligten Signalwege zeigte, dass die MAP-Kinasen ERK, JNK/SAPK und p38 für die IL-2-Induktion durch SIVagm3 notwendig sind, während die Inhibition der Calcineurin-Aktivität durch das Immunsuppressivum Cyclosporin A keinen Einfluss hatte. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis zeigte die Analyse der Transkriptionsfaktor-bindungsstellen des IL-2-Promotors keine Aktivierung der NF-AT-kontrollierten Genexpression durch SIVagm3, womit zum ersten Mal ein Calcineurin/NF-AT-unabhängiger Weg der IL-2-Induktion beschrieben wurde. Dagegen erhöhte SIVagm3 die transkriptionelle Aktivität des NF- κ B-responsiven Elements und die Aktivität des CD28/AP-1-responsiven Elements, die auch bei der klassischen T-Zellaktivierung eine Rolle spielen.

Eine Aktivierung der CD28/AP-1-kontrollierten Genexpression konnte auch durch Expression des viralen Transaktivator-Proteins Tat induziert werden, das in stimulierten Zellen in der Lage war, die IL-2-Expression zu verstärken. Die Beschränkung dieser Tat-Funktion auf stimulierte Zellen konnte aber nicht auf eine Phosphorylierung von SIVagm3-Tat durch die MAP-Kinasen ERK, JNK/SAPK oder p38 zurückgeführt werden. Weitere Analysen zeigten dagegen, dass SIVagm3-Tat durch die Cyclin-abhängige Proteinkinase 9 (CDK9) phosphoryliert wird, die mit Tat koimmunpräzipitiert. Darüberhinaus konnte eine weitere

nicht-identifizierte Tat-assoziierte Kinase nachgewiesen werden, die SIVagm3-Tat ebenfalls phosphorylieren kann.

5.2. Wechselwirkung der mitogenen Signalkaskade mit der Apobec3G-Expression

Aktuelle Publikationen zeigen, dass das lentivirale Vif-Protein die Degradation von Apobec3G im Proteasom induziert, da dieser zelluläre Faktor die Infektiosität der entstehenden Viruspartikel stark reduziert. Die antivirale Funktion von Apobec3G, die in der Deaminierung der Minusstrang-DNA während der reversen Transkription besteht, ist bereits weitgehend aufgeklärt, aber über die Regulation von Apobec3G ist noch wenig bekannt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der mitogenen Raf/MEK/ERK-Signalkaskade durch den Phorbolester TPA zu einer verstärkten Apobec3G-Expression führt. Dieser Effekt konnte durch den Proteinkinase C (PKC)-Inhibitor Staurosporin und den MEK-Inhibitor U0126 inhibiert werden, wodurch gezeigt wurde, dass die Aktivität der MAP-Kinase ERK für die Verstärkung der Apobec3G-Expression notwendig ist. Eine Phosphorylierung von Apobec3G durch ERK wurde im Kinase-Assay jedoch nicht beobachtet. Dagegen konnte durch radioaktive *in-vivo*-Markierung nachgewiesen werden, dass es sich bei Apobec3G nicht um ein Phosphoprotein handelt.

Neben den Untersuchungen zur Regulation von Apobec3G, konnten neue Erkenntnisse zu den Apobec3G/Vif-Interaktionen gewonnen werden. Durch Koimmunpräzipitationsstudien wurde die physikalische Interaktion von Vif und Apobec3G nachgewiesen. Zudem konnte gezeigt werden, dass in Gegenwart von Vif der Einbau von Apobec3G in die Viruspartikel gehemmt wird. Damit wurden erste Hinweise gefunden, dass Vif neben der Induktion des proteolytischen Abbaus von Apobec3G weitere Strategien anwendet, um die Inkorporation des antiviralen Faktors zu verhindern.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- ABBAS A. & LICHTMAN A. Cellular and Molecular Immunology. W.B. Saunders, Philadelphia, 2003
- ADACHI A., GENDELMAN H.E., KOENIG S., FOLKS T., WILLEY R., RABSON A. & MARTIN M.A. (1986) Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J. Virol.* **59**, 284-291.
- ALCE T.M. & POPIK W. (2004) APOBEC3G is incorporated into virus-like particles by a direct interaction with HIV-1 Gag nucleocapsid protein. *J. Biol. Chem.* **279**, 34083-34086.
- ALLAN J.S., SHORT M., TAYLOR M.E., SU S., HIRSCH V.M., JOHNSON P.R., SHAW G.M. & HAHN B.H. (1991) Species-specific diversity among simian immunodeficiency viruses from African green monkeys. *J. Virol.* **65**, 2816-2828.
- ANDERSSON S. (2001) HIV-2 and the immune response. *AIDS Rev.* **3**, 11-23.
- ARYA S.K., GUO C., JOSEPHS S.F. & WONG-STAAAL F. (1985) Trans-activator gene of human T-lymphotropic virus type III (HTLV-III). *Science* **229**, 69-73.
- AVOTS A., HOFFMEYER A., FLORY E., CIMANIS A., RAPP U.R. & SERFLING E. (1997) GABP factors bind to a distal interleukin 2 (IL-2) enhancer and contribute to c-Raf-mediated increase in IL-2 induction. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 4381-4389.
- BAIER M., WERNER A., CICHUTEK K., GARBER C., MULLER C., KRAUS G., FERDINAND F.J., HARTUNG S., PAPAS T.S. & KURTH R. (1989) Molecularly cloned simian immunodeficiency virus SIVagm3 is highly divergent from other SIVagm isolates and is biologically active in vitro and in vivo. *J. Virol.* **63**, 5119-5123.
- BARRE-SINOUSSE F., CHERMANN J.C., REY F., NUGEYRE M.T., CHAMARET S., GRUEST J., DAUGUET C., AXLER-BLIN C., VEZINET-BRUN F., ROUZIOUX C., ROZENBAUM W. & MONTAGNIER L. (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868-871.
- BENKIRANE M., CHUN R.F., XIAO H., OGRYZKO V.V., HOWARD B.H., NAKATANI Y. & JEANG K.T. (1998) Activation of integrated provirus requires histone acetyltransferase. p300 and P/CAF are coactivators for HIV-1 Tat. *J. Biol. Chem.* **273**, 24898-24905.
- BENNASSER Y., BADOU A., TKACZUK J. & BAHRAOUI E. (2002) Signaling pathways triggered by HIV-1 Tat in human monocytes to induce TNF- α . *Virology* **303**, 174-180.
- BIENIASZ P.D., GRDINA T.A., BOGERD H.P. & CULLEN B.R. (1998) Recruitment of a protein complex containing Tat and cyclin T1 to TAR governs the species specificity of HIV-1 Tat. *EMBO J.* **17**, 7056-7065.
- BRIGATI C., GIACCA M., NOONAN D.M. & ALBINI A. (2003) HIV Tat, its TARgets and the control of viral gene expression. *FEMS Microbiol. Lett.* **220**, 57-65.
- BROUSSARD S.R., STAPRANS S.I., WHITE R., WHITEHEAD E.M., FEINBERG M.B. & ALLAN J.S. (2001) Simian immunodeficiency virus replicates to high levels in naturally infected African green monkeys without inducing immunologic or neurologic disease. *J. Virol.* **75**, 2262-2275.

- CHAKRABARTI L., GUYADER M., ALIZON M., DANIEL M.D., DESROSIERS R.C., TIOLLAIS P. & SONIGO P. (1987) Sequence of simian immunodeficiency virus from macaque and its relationship to other human and simian retroviruses. *Nature* **328**, 543-547.
- CHAKRABARTI L.A. (2004) The paradox of simian immunodeficiency virus infection in sooty mangabeys: active viral replication without disease progression. *Front Biosci.* **9**, 521-539.
- CHANG L. & KARIN M. (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**, 37-40.
- CHEN D., FONG Y. & ZHOU Q. (1999) Specific interaction of Tat with the human but not rodent P-TEFb complex mediates the species-specific Tat activation of HIV-1 transcription. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**, 2728-2733.
- CHEN P., FLORY E., AVOTS A., JORDAN B.W., KIRCHHOFF F., LUDWIG S. & RAPP U.R. (2000) Transactivation of naturally occurring HIV-1 long terminal repeats by the JNK signaling pathway. The most frequent naturally occurring length polymorphism sequence introduces a novel binding site for AP-1 factors. *J.Biol.Chem.* **275**, 20382-20390.
- CICALA C., ARTHOS J., SELIG S.M., DENNIS G., Jr., HOSACK D.A., VAN RYK D., SPANGLER M.L., STEENBEKE T.D., KHAZANIE P., GUPTA N., YANG J., DAUCHER M., LEMPICKI R.A. & FAUCI A.S. (2002) HIV envelope induces a cascade of cell signals in non-proliferating target cells that favor virus replication. *PNAS* **99**, 9380-9385.
- COFFIN J.M., HUGHES S.H. & VARMUS H.E. Retroviruses. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997
- COL E., GILQUIN B., CARON C. & KHOCHBIN S. (2002) Tat-controlled protein acetylation. *J.Biol.Chem.* **277**, 37955-37960.
- CONNOR R.I., CHEN B.K., CHOE S. & LANDAU N.R. (1995) Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes. *Virology* **206**, 935-944.
- CUJEC T.P., OKAMOTO H., FUJINAGA K., MEYER J., CHAMBERLIN H., MORGAN D.O. & PETERLIN B.M. (1997) The HIV transactivator TAT binds to the CDK-activating kinase and activates the phosphorylation of the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Genes & Development* **11**, 2645-2657.
- CULLEN B.R. & GARRETT E.D. (1992) A comparison of regulatory features in primate lentiviruses. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* **8**, 387-393.
- DENG L., AMMOSOVA T., PUMFERY A., KASHANCHI F. & NEKHAI S. (2002) HIV-1 Tat interaction with RNA polymerase II C-terminal domain (CTD) and a dynamic association with CDK2 induce CTD phosphorylation and transcription from HIV-1 promoter. *J.Biol.Chem.* **277**, 33922-33929.
- DUBRIDGE R.B., TANG P., HSIA H.C., LEONG P.M., MILLER J.H. & CALOS M.P. (1987) Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol.Cell Biol.* **7**, 379-387.
- EMERY S., ABRAMS D.I., COOPER D.A., DARBYSHIRE J.H., LANE H.C., LUNDGREN J.D. & NEATON J.D. (2002) The evaluation of subcutaneous proleukin (interleukin-2) in a randomized international trial: rationale, design, and methods of ESPRIT. *Control Clin.Trials* **23**, 198-220.

- ENSOLI B., BUONAGURO L., BARILLARI G., FIORELLI V., GENDELMAN R., MORGAN R.A., WINGFIELD P. & GALLO R.C. (1993) Release, uptake, and effects of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on cell growth and viral transactivation. *J. Virol.* **67**, 277-287.
- FISHER A.G., ENSOLI B., IVANOFF L., CHAMBERLAIN M., PETTEWAY S., RATNER L., GALLO R.C. & WONG-STAAAL F. (1987) The sor gene of HIV-1 is required for efficient virus transmission in vitro. *Science* **237**, 888-893.
- FLORY E., WEBER C.K., CHEN P., HOFFMEYER A., JASSOY C. & RAPP U.R. (1998) Plasma membrane-targeted Raf kinase activates NF-kappaB and human immunodeficiency virus type 1 replication in T lymphocytes. *J. Virol.* **72**, 2788-2794.
- FOLKS T., BENN S., RABSON A., THEODORE T., HOGGAN M.D., MARTIN M., LIGHTFOOTE M. & SELL K. (1985) Characterization of a continuous Tcell line susceptible to the cytopathic effects of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)-associated retrovirus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **82**, 4539-4543.
- GABUZDA D.H., LAWRENCE K., LANGHOFF E., TERWILLIGER E., DORFMAN T., HASELTINE W.A. & SODROSKI J. (1992) Role of vif in replication of human immunodeficiency virus type 1 in CD4+ T lymphocytes. *J. Virol.* **66**, 6489-6495.
- GAO F., BAILES E., ROBERTSON D.L., CHEN Y., RODENBURG C.M., MICHAEL S.F., CUMMINS L.B., ARTHUR L.O., PEETERS M., SHAW G.M., SHARP P.M. & HAHN B.H. (1999) Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* **397**, 436-441.
- GARCIA J.A., WU F.K., MITSUYASU R. & GAYNOR R.B. (1987) Interactions of cellular proteins involved in the transcriptional regulation of the human immunodeficiency virus. *EMBO J.* **6**, 3761-3770.
- GARCIA J.V. & MILLER A.D. (1991) Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef. *Nature* **350**, 508-511.
- GHOSH P., SICA A., CIPPITELLI M., SUBLESKI J., LAHESMAA R., YOUNG H.A. & RICE N.R. (1996) Activation of nuclear factor of activated T cells in a cyclosporin A-resistant pathway. *J.Biol.Chem.* **271**, 7700-7704.
- GLUZMAN Y. (1981) SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* **23**, 175-182.
- GRAZIOSI C., GANTT K.R., VACCAREZZA M., DEMAREST J.F., DAUCHER M., SAAG M.S., SHAW G.M., QUINN T.C., COHEN O.J., WELBON C.C., PANTALEO G. & FAUCI A.S. (1996) Kinetics of cytokine expression during primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**, 4386-4391.
- GU Y. & SUNDQUIST W.I. (2003) Good to CU. *Nature* **424**, 21-22.
- GUEYE A., DIOP O.M., PLOQUIN M.J., KORNFELD C., FAYE A., CUMONT M.C., HURTREL B., BARRE-SINOSSI F. & MULLER-TRUTWIN M.C. (2004) Viral load in tissues during the early and chronic phase of non-pathogenic SIVagm infection. *J.Med.Primatol.* **33**, 83-97.
- HARRICH D., Ulich C., GARCIA-MARTINEZ L.F. & GAYNOR R.B. (1997) Tat is required for efficient HIV-1 reverse transcription. *EMBO J.* **16**, 1224-1235.

- HARRIS R.S., BISHOP K.N., SHEEHY A.M., CRAIG H.M., PETERSEN-MAHRT S.K., WATT I.N., NEUBERGER M.S. & MALIM M.H. (2003) DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell* **113**, 803-809.
- HAUBER J., MALIM M.H. & CULLEN B.R. (1989) Mutational analysis of the conserved basic domain of human immunodeficiency virus tat protein. *J.Virol.* **63**, 1181-1187.
- HEAPHY S., DINGWALL C., ERNBERG I., GAIT M.J., GREEN S.M., KARN J., LOWE A.D., SINGH M. & SKINNER M.A. (1990) HIV-1 regulator of virion expression (Rev) protein binds to an RNA stem-loop structure located within the Rev response element region. *Cell* **60**, 685-693.
- HEMONNOT B., CARTIER C., GAY B., REBUFFAT S., BARDY M., DEVAUX C., BOYER V. & BRIANT L. (2004) The host cell MAP kinase ERK-2 regulates viral assembly and release by phosphorylating the p6gag protein of HIV-1. *J.Biol.Chem.* **279**, 32426-32434.
- HIRSCH V.M., OLMSTED R.A., MURPHEY-CORB M., PURCELL R.H. & JOHNSON P.R. (1989) An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature* **339**, 389-392.
- HIRSCH V.M., DAPOLITO G., JOHNSON P.R., ELKINS W.R., LONDON W.T., MONTALI R.J., GOLDSTEIN S. & BROWN C. (1995) Induction of AIDS by simian immunodeficiency virus from an African green monkey: species-specific variation in pathogenicity correlates with the extent of in vivo replication. *J.Virol.* **69**, 955-967.
- HIRSCH V.M. (2004) What can natural infection of African monkeys with simian immunodeficiency virus tell us about the pathogenesis of AIDS? *AIDS Rev.* **6**, 40-53.
- HOFFMEYER A., AVOTS A., FLORY E., WEBER C.K., SERFLING E. & RAPP U.R. (1998) The GABP-responsive element of the interleukin-2 enhancer is regulated by JNK/SAPK-activating pathways in T lymphocytes. *J.Biol.Chem.* **273**, 10112-10119.
- HOGAN P.G., CHEN L., NARDONE J. & RAO A. (2003) Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev.* **17**, 2205-2232.
- HONJO S., NARITA T., KOBAYASHI R., HIYAOKA A., FUJIMOTO K., TAKASAKA M., SAKAKIBARA I., MUKAI R., ISHIKAWA K., OHTA Y. & . (1990) Experimental infection of African green monkeys and cynomolgus monkeys with a SIVAGM strain isolated from a healthy African green monkey. *J.Med.Primatol.* **19**, 9-20.
- HUET T., CHEYNIER R., MEYERHANS A., ROELANTS G. & WAIN-HOBSON S. (1990) Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. *Nature* **345**, 356-359.
- IZMAILOVA E., BERTLEY F.M., HUANG Q., MAKORI N., MILLER C.J., YOUNG R.A. & ALDOVINI A. (2003) HIV-1 Tat reprograms immature dendritic cells to express chemoattractants for activated T cells and macrophages. *Nature medicine* **9**, 191-197.
- JACQUE J.M., MANN A., ENSLEN H., SHAROVA N., BRICHACEK B., DAVIS R.J. & STEVENSON M. (1998) Modulation of HIV-1 infectivity by MAPK, a virion-associated kinase. *EMBO J.* **17**, 2607-2618.
- JAIN J., LOH C. & RAO A. (1995) Transcriptional regulation of the IL-2 gene. *Curr.Opin.Immunol.* **7**, 333-342.
- JAINCHILL J.L., AARONSON S.A. & TODARO G.J. (1969) Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *J.Virol.* **4**, 549-553.

- JEANG K. HIV-1 Tat: structure and function, in: The human retroviruses and AIDS 1996 Compendium. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, 1996
- JENSEN F.C., GIRARDI A.J., GILDEN R.V. & KOPROWSKI H. (1964) INFECTION OF HUMAN AND SIMIAN TISSUE CULTURES WITH ROUS SARCOMA VIRUS. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **52**, 53-59.
- JOHNSON P.R., GOLDSTEIN S., LONDON W.T., FOMSGAARD A. & HIRSCH V.M. (1990) Molecular clones of SIVsm and SIVagm: experimental infection of macaques and African green monkeys. *J.Med.Primatol.* **19**, 279-286.
- JORGENSEN K.A., KOEFOED-NIELSEN P.B. & KARAMPERIS N. (2003) Calcineurin phosphatase activity and immunosuppression. A review on the role of calcineurin phosphatase activity and the immunosuppressive effect of cyclosporin A and tacrolimus. *Scand.J.Immunol.* **57**, 93-98.
- KAMEOKA M., RONG L., GOTTE M., LIANG C., RUSSELL R.S. & WAINBERG M.A. (2001) Role for human immunodeficiency virus type 1 Tat protein in suppression of viral reverse transcriptase activity during late stages of viral replication. *J Virol* **75**, 2675-2683.
- KAMEOKA M., MORGAN M., BINETTE M., RUSSELL R.S., RONG L., GUO X., MOULAND A., KLEIMAN L., LIANG C. & WAINBERG M.A. (2002) The Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) can promote placement of tRNA primer onto viral RNA and suppress later DNA polymerization in HIV-1 reverse transcription. *J.Virol.* **76**, 3637-3645.
- KARN J. (1999) Tackling Tat. *J.Mol.Biol.* **293**, 235-254.
- KAUR A., YANG J., HEMPEL D., GRITZ L., MAZZARA G.P., MCCLURE H. & JOHNSON R.P. (2000) Identification of multiple simian immunodeficiency virus (SIV)-specific CTL epitopes in sooty mangabeys with natural and experimentally acquired SIV infection. *J.Immunol.* **164**, 934-943.
- KAUR A., ALEXANDER L., STAPRANS S.I., DENEKAMP L., HALE C.L., MCCLURE H.M., FEINBERG M.B., DESROSIERS R.C. & JOHNSON R.P. (2001) Emergence of cytotoxic T lymphocyte escape mutations in nonpathogenic simian immunodeficiency virus infection. *Eur.J.Immunol.* **31**, 3207-3217.
- KIERNAN R.E., VANHULLE C., SCHILTZ L., ADAM E., XIAO H., MAUDOUX F., CALOMME C., BURNY A., NAKATANI Y., JEANG K.T., BENKIRANE M. & VAN LINT C. (1999) HIV-1 tat transcriptional activity is regulated by acetylation. *EMBO J.* **18**, 6106-6118.
- KIRCHHOFF F., SCHINDLER M., BAILER N., RENKEMA G.H., SAKSELA K., KNOOP V., MULLER-TRUTWIN M.C., SANTIAGO M.L., BIBOLLET-RUCHE F., DITTMAR M.T., HEENEY J.L., HAHN B.H. & MUNCH J. (2004) Nef proteins from simian immunodeficiency virus-infected chimpanzees interact with p21-activated kinase 2 and modulate cell surface expression of various human receptors. *J.Virol.* **78**, 6864-6874.
- KOLCH W. (2000) Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem.J.* **351**, 289-305.
- KRAUS G., WERNER A., BAIER M., BINNIGER D., FERDINAND F.J., NORLEY S. & KURTH R. (1989) Isolation of human immunodeficiency virus-related simian immunodeficiency viruses from African green monkeys. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **86**, 2892-2896.

- KUIKEN C., FOLEY B., HAHN B., MARX P., MCCUTCHAN F., MELLORS J., MULLINS J., SODROSKI J., WOLINSKY S. & KORBER B. HIV Sequence Compendium 2000. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, 2000
- KYRIAKIS J.M., BANERJEE P., NIKOLAKAKI E., DAI T., RUBIE E.A., AHMAD M.F., AVRUCH J. & WOODGETT J.R. (1994) The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* **369**, 156-160.
- LETVIN N.L., EATON K.A., ALDRICH W.R., SEHGAL P.K., BLAKE B.J., SCHLOSSMAN S.F., KING N.W. & HUNT R.D. (1983) Acquired immunodeficiency syndrome in a colony of macaque monkeys. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **80**, 2718-2722.
- LEVY Y., DURIER C., KRZYSIEK R., RABIAN C., CAPITANT C., LASCAUX A.S., MICHON C., OKSENHENDLER E., WEISS L., GASTAUT J.A., GOUJARD C., ROUZIOUX C., MARAL J., DELFRAISSY J.F., EMILIE D. & ABOULKER J.P. (2003) Effects of interleukin-2 therapy combined with highly active antiretroviral therapy on immune restoration in HIV-1 infection: a randomized controlled trial. *AIDS* **17**, 343-351.
- LIANG C. & WAINBERG M.A. (2002) The role of Tat in HIV-1 replication: an activator and/or a suppressor? *AIDS Rev.* **4**, 41-49.
- LODISH H., BERK A., ZIPURSKY S.L., MATSUDAIRA P., BALTIMORE D. & DARNELL J.E. Molekulare Zellbiologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2001
- MACIAN F., LOPEZ-RODRIGUEZ C. & RAO A. (2001) Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene* **20**, 2476-2489.
- MANGEAT B., TURELLI P., CARON G., FRIEDLI M., PERRIN L. & TRONO D. (2003) Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* **424**, 99-103.
- MARIANI R., CHEN D., SCHROFELBAUER B., NAVARRO F., KONIG R., BOLLMAN B., MUNK C., NYMARK-MCMAHON H. & LANDAU N.R. (2003) Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell* **114**, 21-31.
- MARIN M., ROSE K.M., KOZAK S.L. & KABAT D. (2003) HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nat.Med.* **9**, 1398-1403.
- MAYNE M., HOLDEN C.P., NATH A. & GEIGER J.D. (2000) Release of calcium from inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-regulated stores by HIV-1 Tat regulates TNF-alpha production in human macrophages. *J.Immunol.* **164**, 6538-6542.
- MCGUIRE K.L. & IACOBELLI M. (1997) Involvement of Rel, Fos, and Jun proteins in binding activity to the IL-2 promoter CD28 response element/AP-1 sequence in human T cells. *J.Immunol.* **159**, 1319-1327.
- MEHLE A., STRACK B., ANCUTA P., ZHANG C., MCPIKE M. & GABUZDA D. (2004) Vif overcomes the innate antiviral activity of APOBEC3G by promoting its degradation in the ubiquitin-proteasome pathway. *J.Biol.Chem.* **279**, 7792-7798.
- MERCURIO F. & MANNING A.M. (1999) Multiple signals converging on NF-kappaB. *Curr.Opin.Cell Biol.* **11**, 226-232.

- MISCHIATI C., PIRONI F., MILANI D., GIACCA M., MIRANDOLA P., CAPITANI S. & ZAULI G. (1999) Extracellular HIV-1 Tat protein differentially activates the JNK and ERK/MAPK pathways in CD4 T cells. *AIDS* **13**, 1637-1645.
- MODROW S. & FALKE D. Molekulare Virologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1998
- MULLER-TRUTWIN M.C., CORBET S., TAVARES M.D., HERVE V.M., NERRIENET E., GEORGES-COURBOT M.C., SAURIN W., SONIGO P. & BARRE-SINOUSSE F. (1996) The evolutionary rate of nonpathogenic simian immunodeficiency virus (SIVagm) is in agreement with a rapid and continuous replication in vivo. *Virology* **223**, 89-102.
- MULLER M.C. & BARRE-SINOUSSE F. (2003) SIVagm: genetic and biological features associated with replication. *Front Biosci.* **8**, d1170-d1185
- MURPHY L.L. & HUGHES C.C. (2002) Endothelial cells stimulate T cell NFAT nuclear translocation in the presence of cyclosporin A: involvement of the wnt/glycogen synthase kinase-3 beta pathway. *J.Immunol.* **169**, 3717-3725.
- MUSTELIN T. & TASKEN K. (2003) Positive and negative regulation of Tcell activation through kinases and phosphatases. *Biochem.J.* **371**, 15-27.
- NABEL G. & BALTIMORE D. (1987) An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. *Nature* **326**, 711-713.
- NAUMANN U., HOFFMEYER A., FLORY E. & RAPP U.R. Raf protein serine/threonine kinases, in: Protein phosphorylation. Eds. F. Marks, VCH mbH, Weinheim, 1996
- NATH A., CONANT K., CHEN P., SCOTT C. & MAJOR E.O. (1999) Transient exposure to HIV-1 Tat protein results in cytokine production in macrophages and astrocytes. A hit and run phenomenon. *J.Biol.Chem.* **274**, 17098-17102.
- NEKHAI S., SHUKLA R.R. & KUMAR A. (1997) A human primary Tlymphocyte-derived human immunodeficiency virus type 1 Tat-associated kinase phosphorylates the C-terminal domain of RNA polymerase II and induces CAK activity. *J.Virol.* **71**, 7436-7441.
- NEKHAI S., ZHOU M., FERNANDEZ A., LANE W.S., LAMB N.J., BRADY J. & KUMAR A. (2002) HIV-1 Tat-associated RNA polymerase Cterminal domain kinase, CDK2, phosphorylates CDK7 and stimulates Tat-mediated transcription. *Biochem.J.* **364**, 649-657.
- NELSON B.H. (2002) Interleukin-2 signaling and the maintenance of self-tolerance. *Curr.Dir.Autoimmun.* **5**, 92-112.
- OKKENHAUG K. & VANHAESEBROECK B. (2003) PI3K in lymphocyte development, differentiation and activation. *Nat.Rev.Immunol.* **3**, 317-330.
- OTT M., EMILIANI S., VAN LINT C., HERBEIN G., LOVETT J., CHIRMULE N., MCCLOSKEY T., PAHWA S. & VERDIN E. (1997) Immune hyperactivation of HIV-1-infected T cells mediated by Tat and the CD28 pathway. *Science* **275**, 1481-1485.
- OTT M., LOVETT J.L., MUELLER L. & VERDIN E. (1998) Superinduction of IL-8 in T cells by HIV-1 Tat protein is mediated through NF-kappaB factors. *J.Immunol.* **160**, 2872-2880.

- PANCIO H.A., VANDER H.N. & RATNER L. (2000) The C-terminal proline-rich tail of human immunodeficiency virus type 2 Vpx is necessary for nuclear localization of the viral preintegration complex in nondividing cells. *J. Virol.* **74**, 6162-6167.
- PAREDES R., LOPEZ BENALDO DE QUIROS JC, FERNANDEZ-CRUZ E., CLOTET B. & LANE H.C. (2002) The potential role of interleukin-2 in patients with HIV infection. *AIDS Rev.* **4**, 36-40.
- PEETERS M., COURGNAUD V. & ABELA B. (2001) Genetic diversity of lentiviruses in non-human primates. *AIDS Rev.* **3**, 3-10.
- PHILIPPON V., MATSUDA Z. & ESSEX M. (1999) Transactivation is a conserved function among primate lentivirus Vpr proteins but is not shared by Vpx. *J. Hum. Virol.* **2**, 167-174.
- POPIK W. & PITHA P.M. (1996) Binding of human immunodeficiency virus type 1 to CD4 induces association of Lck and Raf-1 and activates Raf-1 by a Ras-independent pathway. *Mol. Cell Biol.* **16**, 6532-6541.
- POPIK W., HESSELGESSER J.E. & PITHA P.M. (1998) Binding of human immunodeficiency virus type 1 to CD4 and CXCR4 receptors differentially regulates expression of inflammatory genes and activates the MEK/ERK signaling pathway. *J. Virol.* **72**, 6406-6413.
- POPIK W. & PITHA P.M. (1998) Early activation of mitogen-activated protein kinase kinase, extracellular signal-regulated kinase, p38 mitogen-activated protein kinase, and c-Jun N-terminal kinase in response to binding of simian immunodeficiency virus to Jurkat T cells expressing CCR5 receptor. *Virology* **252**, 210-217.
- POPIK W. & PITHA P.M. (2000) Exploitation of cellular signaling by HIV-1: unwelcome guests with master keys that signal their entry. *Virology* **276**, 1-6.
- POPOV S., REXACH M., ZYBARTH G., REILING N., LEE M.A., RATNER L., LANE C.M., MOORE M.S., BLOBEL G. & BUKRINSKY M. (1998) Viral protein R regulates nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex. *EMBO J.* **17**, 909-917.
- POPOVIC M., SARNGADHARAN M.G., READ E. & GALLO R.C. (1984) Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* **224**, 497-500.
- PU H., TIAN J., FLORA G., LEE Y.W., NATH A., HENNIG B. & TOBOREK M. (2003) HIV-1 Tat protein upregulates inflammatory mediators and induces monocyte invasion into the brain. *Mol. Cell Neurosci.* **24**, 224-237.
- RICE A.P. & MATHEWS M.B. (1988) Transcriptional but not translational regulation of HIV-1 by the tat gene product. *Nature* **332**, 551-553.
- RINCON M. (2001) MAP-kinase signaling pathways in T cells. *Curr. Opin. Immunol.* **13**, 339-345.
- ROUSE J., COHEN P., TRIGON S., MORANGE M., ALONSO-LLAMAZARES A., ZAMANILLO D., HUNT T. & NEBREDA A.R. (1994) A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* **78**, 1027-1037.

- RUBEN S., PERKINS A., PURCELL R., JOUNG K., SIA R., BURGHOFF R., HASELTINE W.A. & ROSEN C.A. (1989) Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus tat protein. *J. Virol.* **63**, 1-8.
- SCHAEFER T.M., BELL I., PFEIFER M.E., GHOSH M., TRIBLE R.P., FULLER C.L., ASHMAN C. & REINHART T.A. (2002) The conserved process of TCR/CD3 complex down-modulation by SIV Nef is mediated by the central core, not endocytic motifs. *Virology* **302**, 106-122.
- SCHRAGER J.A., DER M., V & MARSH J.W. (2002) HIV Nef increases T cell ERK MAP kinase activity. *J. Biol. Chem.* **277**, 6137-6142.
- SCHRODER A.R., SHINN P., CHEN H., BERRY C., ECKER J.R. & BUSHMAN F. (2002) HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* **110**, 521-529.
- SCHULTZ M., CLARKE S.H., ARNOLD L.W., SARTOR R.B. & TONKONOGY S.L. (2001) Disrupted B-lymphocyte development and survival in interleukin-2-deficient mice. *Immunology* **104**, 127-134.
- SCHWARTZ O., MARECHAL V., LE GALL S., LEMONNIER F. & HEARD J.M. (1996) Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat. Med.* **2**, 338-342.
- SEGER R. & KREBS E.G. (1995) The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* **9**, 726-735.
- SERFLING E., AVOTS A. & NEUMANN M. (1995) The architecture of the interleukin-2 promoter: a reflection of T lymphocyte activation. *Biochim. Biophys. Acta* **1263**, 181-200.
- SHAULIAN E. & KARIN M. (2001) AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* **20**, 2390-2400.
- SHEEHY A.M., GADDIS N.C., CHOI J.D. & MALIM M.H. (2002) Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* **418**, 646-650.
- SHEEHY A.M., GADDIS N.C. & MALIM M.H. (2003) The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nat. Med.* **9**, 1404-1407.
- SILVESTRI G., SODORA D.L., KOUP R.A., PAIARDINI M., O'NEIL S.P., MCCLURE H.M., STAPRANS S.I. & FEINBERG M.B. (2003) Nonpathogenic SIV infection of sooty mangabeys is characterized by limited bystander immunopathology despite chronic high-level viremia. *Immunity* **18**, 441-452.
- SMITH S.M., PENTLICKY S., KLASE Z., SINGH M., NEUVEUT C., LU C.Y., REITZ M.S., Jr., YARCHOAN R., MARX P.A. & JEANG K.T. (2003) An in vivo replication-important function in the second coding exon of Tat is constrained against mutation despite cytotoxic T lymphocyte selection. *J. Biol. Chem.* **278**, 44816-44825.
- STELLBRINK H.J., VAN LUNZEN J., WESTBY M., O'SULLIVAN E., SCHNEIDER C., ADAM A., WEITNER L., KUHLMANN B., HOFFMANN C., FENSKE S., ARIES P.S., DEGEN O., EGGERS C., PETERSEN H., HAAG F., HORST H.A., DALHOFF K., MOCKLINGHOFF C., CAMMACK N., TENNER-RACZ K. & RACZ P. (2002) Effects of interleukin-2 plus highly active antiretroviral therapy on HIV-1 replication and proviral DNA (COSMIC trial). *AIDS* **16**, 1479-1487.
- STEVENSON M. (2003) HIV-1 pathogenesis. *Nat. Med.* **9**, 853-860.

- STREBEL K., DAUGHERTY D., CLOUSE K., COHEN D., FOLKS T. & MARTIN M.A. (1987) The HIV 'A' (sor) gene product is essential for virus infectivity. *Nature* **328**, 728-730.
- TAN S.L. & PARKER P.J. (2003) Emerging and diverse roles of protein kinase C in immune cell signalling. *Biochem.J.* **376**, 545-552.
- TAO L., WADSWORTH S., MERCER J., MUELLER C., LYNN K., SIEKIERKA J. & AUGUST A. (2002) Opposing roles of serine/threonine kinases MEKK1 and LOK in regulating the CD28 responsive element in T-cells. *Biochem.J.* **363**, 175-182.
- UENO F., SHIOTA H., MIYAURA M., YOSHIDA A., SAKURAI A., TATSUKI J., KOYAMA A.H., AKARI H., ADACHI A. & FUJITA M. (2003) Vpx and Vpr proteins of HIV-2 up-regulate the viral infectivity by a distinct mechanism in lymphocytic cells. *Microbes.Infect.* **5**, 387-395.
- VARIN A., MANNA S.K., QUIVY V., DECRION A.Z., VAN LINT C., HERBEIN G. & AGGARWAL B.B. (2003) Exogenous Nef protein activates NF-kappa B, AP-1, and c-Jun N-terminal kinase and stimulates HIV transcription in promonocytic cells. Role in AIDS pathogenesis. *J.Biol.Chem.* **278**, 2219-2227.
- VERHOEF K., BAUER M., MEYERHANS A. & BERKHOUT B. (1998) On the role of the second coding exon of the HIV-1 Tat protein in virus replication and MHC class I downregulation. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* **14**, 1553-1559.
- WANG K.S., FRANK D.A. & RITZ J. (2000) Interleukin-2 enhances the response of natural killer cells to interleukin-12 through up-regulation of the interleukin-12 receptor and STAT4. *Blood* **95**, 3183-3190.
- WEI B.L., ARORA V.K., FOSTER J.L., SODORA D.L. & GARCIA J.V. (2003) In vivo analysis of Nef function. *Curr.HIV.Res.* **1**, 41-50.
- WILLEY R.L., MALDARELLI F., MARTIN M.A. & STREBEL K. (1992) Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein regulates the formation of intracellular gp160-CD4 complexes. *J.Virol.* **66**, 226-234.
- WU Y. & MARSH J.W. (2001) Selective transcription and modulation of resting T cell activity by preintegrated HIV DNA. *Science* **293**, 1503-1506.
- YAMAMOTO Y. & GAYNOR R.B. (2004) IkkappaB kinases: key regulators of the NF-kappaB pathway. *Trends Biochem.Sci.* **29**, 72-79.
- YANG X., HERRMANN C.H. & RICE A.P. (1996) The human immunodeficiency virus Tat proteins specifically associate with TAK in vivo and require the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II for function. *J.Virol.* **70**, 4576-4584.
- YANG X. & GABUZDA D. (1998) Mitogen-activated protein kinase phosphorylates and regulates the HIV-1 Vif protein. *J.Biol.Chem.* **273**, 29879-29887.
- YANG X., CHEN Y. & GABUZDA D. (1999) ERK MAP kinase links cytokine signals to activation of latent HIV-1 infection by stimulating a cooperative interaction of AP-1 and NF- kappaB. *J.Biol.Chem.* **274**, 27981-27988.
- YANG X. & GABUZDA D. (1999) Regulation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity by the ERK mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J.Virol.* **73**, 3460-3466.

- YU X., YU Y., LIU B., LUO K., KONG W., MAO P. & YU X.F. (2003) Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science* **302**, 1056-1060.
- ZHANG H., YANG B., POMERANTZ R.J., ZHANG C., ARUNACHALAM S.C. & GAO L. (2003) The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature* **424**, 94-98.
- ZHOU X.Y., YASHIRO-OHTANI Y., NAKAHIRA M., PARK W.R., ABE R., HAMAOKA T., NARAMURA M., GU H. & FUJIWARA H. (2002) Molecular mechanisms underlying differential contribution of CD28 versus non-CD28 costimulatory molecules to IL-2 promoter activation. *J.Immunol.* **168**, 3847-3854.

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Ampere
aa	Aminosäure(n)
Abb.	Abbildung
agm	Afrikanische Grüne Meerkatze (Genus <i>Chlorocebus</i>)
AICD	„activation induced cell death“, aktivierungsinduzierter Zelltod
AIDS	„acquired immunodeficiency syndrome“, erworbenes Immunschwächesyndrom
Amp	Ampicillin
AP-1	„activator protein“, Familie von Transkriptionsfaktoren
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
cpz	Schimpanse (<i>Pan troglodytes</i>)
CD	„cluster of differentiation“
Ci	Curie, Einheit der Radioaktivität, entspricht 37×10^9 radioaktiven Zerfällen pro sec.
CMV	Cytomegalievirus
col	Mantelaffe (<i>Colobus guereza</i>)
cpm	„counts per minute“
CTD	C-terminale Domäne (der RNA Polymerase II)
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
CyA	Cyclosporin A
DAG	Diacylglycerol
DC	dendritische Zelle
DMEM	„Dulbecco's modified Eagle's Medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	„enhanced chemoluminescence“
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“
<i>env</i>	„envelope“, retrovirales Gen, das für die Hüllproteine kodiert
ENV	Genprodukt des <i>env</i> -Gens

ER	endoplasmatisches Reticulum
ERK	„extracellular signal-regulated protein kinase“
FKS	fötales Kälberserum
g	Gramm
<i>gag</i>	„group-specific antigens“, retrovirales Gen, das für innere Strukturproteine kodiert
GAG	Genprodukt des <i>gag</i> -Gens
GDP	Guaninnucleotiddiphosphat
gp	Glykoprotein
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guaninnucleotidtriphosphat
h	Stunde
HAART	„highly active antiretroviral therapy“
HIV	humanes Immundefizienzvirus
IE	Immunitätseinheit
I- κ B	Inhibitor des Transkriptionsfaktors NF- κ B
IKK	I- κ B-Kinase
IL	Interleukin
I(ono)	Ionomycin
IP	Immunpräzipitation
JNK	„c-Jun NH2-terminal kinase“
KA	Kinase-Assay
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Bertani
Ihoest	Vollbartmeerkatze (<i>Cercopithecus lhoesti</i>)
LTR	„long terminal repeat“, Endsequenzen des retroviralen Genoms
Luc	Luciferase
μ	mikro
m	Milli
M	molar
mac	Makake
MACS	„magnetic cell sorting“, magnetische Zellsortierung
MAPK	„mitogen-activated protein kinases“
MBP	„myelin basic protein“
MHC	„major histocompatibility complex“

min.	Minute(n)
moi	„multiplicity of infection“
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MP	Minimalpromotor
mRNA	„messenger RNA“
NK	natürliche Killerzelle
NF-AT	„nuclear factor of activated T cells“, Transkriptionsfaktor-Familie
NF-κB	„nuclear factor κB“, Transkriptionsfaktor-Familie
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBMC	„peripheral blood mononuclear cells“, mononukleäre Zellen des peripheren Bluts
PBS	„phosphate buffered saline“, phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	„polymerase chain reaction“, Polymerasekettenreaktion
PEI	Paul-Ehrlich-Institut
PHA	Phytohämagglutinin
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
<i>pol</i>	„polymerase“, retrovirales Gen, kodiert für Polymerase und andere virale Enzyme
POL	Genprodukt des <i>pol</i> -Gens
poly(A)	Polyadenylierung
RE	responsives Element
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	„rounds per minute“, Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
SAIDS	„simian AIDS“, AIDS-Erkrankung der Affen
SAPK	„stress-activated protein kinase“
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec.	Sekunden
SIV	simianes Immundefizienzvirus
smm	rauchgraue Mangabe (<i>Cercocebus atys</i>)
ss	„single stranded“, einzelsträngig
syk	Weißkehlmeerkatze (<i>Cercopithecus mitis albogularis</i>)
TCID ₅₀	„tissue culture infectious dosis 50%“
TCR	T-Zellrezeptor
TPA	12-O-tetradodecanoyl-phorbol-13-acetat

Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt
v/v	„volume per volume“
w/v	„weight per volume“
WB	Western Blot

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN:

Name: Heide Vera Muckenfuß
Geburtsdatum: 30. Mai 1977
Geburtsort: Neustadt an der Weinstraße
Staatsangehörigkeit: deutsch

SCHULAUSSBILDUNG:

08/1983 – 07/1987 Dr.-Albert-Fink-Grundschule Neustadt
08/1987 – 06/1996 Leibniz-Gymnasium Neustadt
Abschluss: Abitur

HOCHSCHULAUSSBILDUNG:

10/1996 – 09/1998 Grundstudium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Abschluss: Vordiplom
10/1998 – 04/2001 Hauptstudium der Biochemie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt a. M.
Abschluss: Diplom
10/2000 – 04/2001 Diplomarbeit in der Abteilung Medizinische Biotechnologie am Paul-Ehrlich-Institut, Langen unter der Leitung von Prof. Dr. K. Cichutek
Thema: Aktivierung responsiver DNA-Elemente durch simiane Immundefizienzviren
seit 06/2001 Promotion in der Abteilung Medizinische Biotechnologie am Paul-Ehrlich-Institut, Langen unter der Leitung von Prof. Dr. K. Cichutek
Thema: Regulation der Expression von Interleukin-2 und Apobec3G im Kontext der Infektion mit Immundefizienzviren

TEILERGEBNISSE DIESER ARBEIT SIND IN FOLGENDEN PUBLIKATIONEN UND PRÄSENTATIONEN VERÖFFENTLICHT WORDEN:

Publikationen:

Heide Muckenfuss, Ralf Sanzenbacher, Matthias Hamdorf, Ulrich Tschulena, Eva Distler, Klaus Cichutek and Egbert Flory

SIVagm3 induces Interleukin-2 expression via the CD28RE located on the IL-2 promoter.

International Cytokine Society-Annual Meeting, MEDIMOND Publications, Bologna, 2004, ISBN 88-7587-013-6, S. 99-104

Heide Muckenfuss, Ralf Sanzenbacher, Matthias Hamdorf, Ulrich Tschulena, Andris Avots, Klaus Cichutek and Egbert Flory

Interleukin-2 induction by simian immunodeficiency virus SIVagm3 involves MAPK activity but is independent on Calcineurin /NF-AT signaling.

eingereicht bei The Journal of Biological Chemistry

Ulrich Tschulena, Ralf Sanzenbacher, Roland Plesker, Cheick Coulibaly, Sylvia Raupp, Renate Wenig, Heide Muckenfuss, Matthias Hamdorf, Michael D Mühlebach, Matthias Schweizer, Klaus Cichutek and Egbert Flory

Raf-binding domain in Nef of SIVsmmPBj is essential for acute lethal enteropathic disease.

eingereicht bei EMBO

Ralf Sanzenbacher, Ulrich Tschulena, Roland Plesker, Cheick Coulibaly, Sylvia Raupp, Renate Wenig, Heide Muckenfuss, Klaus Cichutek and Egbert Flory

New insights in retroviral pathogenicity: The Raf-binding domain of Nef is involved in acute lethal enteropathy.

XV International AIDS Conference, MEDIMOND Publications, Bologna, 2004, ISBN 88-7587-065-9, S. 31-34

Vortrag:

H. Muckenfuss, R. Sanzenbacher, U. Tschulena, K. Cichutek and E. Flory

Tat protein of SIVagm3 is a phosphorylation-target and is involved in virus-induced IL-2 activation.

24. Tagung der Gesellschaft für Virologie, Berlin, Germany, 26.03.03 - 29.03.03

Poster:

H. Muckenfuss, R. Sanzenbacher, U. Tschulena, K. Cichutek and E. Flory

Tat protein of apathogenic SIVagm3 is a phosphorylation target of MAP kinases in virus-induced IL-2 activation.

6th Joint meeting of the Signal Transduction Society (STS), Weimar, Germany, 07.11.02-09.11.02.

H. Muckenfuss, R. Sanzenbacher, U. Tschulena, M. Hamdorf, A. Avots, K. Cichutek and E. Flory

Intracellular MAPK signalling pathways are involved in SIVagm3-induced upregulation of IL-2 gene expression.

International Cytokine Society, Annual Meeting 2003, 20-24th September, Trinity College Dublin, Ireland

DANKSAGUNG

Prof. Dr. Klaus Cichutek danke ich für die Möglichkeit, am Paul-Ehrlich-Institut unter besten Arbeitsbedingungen promovieren zu können.

Prof. Dr. Bernd Ludwig danke ich für die freundliche Betreuung von Universitätsseite.

Dr. Egbert Flory gilt mein besonderer Dank für die hervorragende fachliche Betreuung und engagierte Unterstützung dieser Arbeit, insbesondere für seine ansteckende Motivation und Begeisterungsfähigkeit, die für ein sehr positives Arbeitsklima sorgte.

Dr. Carsten Münk danke ich für die Unterstützung des Apobec3G-Projektes und für das Anzetteln von Kooperationen.

Sylvia Raupp, Dr. Ralf Sanzenbacher, Dr. Uli Tschulena und Renate Wenig danke ich für die gute wissenschaftliche Zusammenarbeit, mein spezieller Dank gilt Matthias Hamdorf für seine hilfsbereite Unterstützung bei diversen Computerproblemen.

Allen jetzigen und ehemaligen Mitforschern in der Abteilung 6 danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die interessanten Diskussionen wissenschaftlicher und nicht-wissenschaftlicher Art.

Abschließend danke ich meiner Familie, insbesondere Stephan Herr danke ich für das gründliche Korrekturlesen und die Geduld.